

Aus dem Bereich Transplantations- und Infektionsimmunologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Die Anwendung eines durchflusszytometrischen Interferon- γ
Release Assays zur Diagnostik einer latenten Infektion mit
M. tuberculosis bei gesunden Kindern und Kindern mit
chronischen Erkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012

vorgelegt von Julia Hanna Elsäßer
geb. am 15. Mai 1985 in Singen

Aus dem Institut für Infektions- und Transplantationsimmunologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	9
	2.1 Grundlagen der angeborenen und adaptiven Immunantwort	9
	2.2 Grundlagen der Tuberkulose	11
	2.2.1 Pathogenese der Tuberkulose	11
	2.2.2 Klinik und Therapie	12
	2.3 Nachweis einer latenten Tuberkuloseinfektion	13
	2.3.1 Tuberkulinhauttest	14
	2.3.2 T-Zell Interferon- γ Tests	15
	2.4 Indikationen zum Tuberkulosescreeing	17
	2.4.1 Tuberkulosescreeing bei Umgebungsuntersuchungen	17
	2.4.2 Tuberkulosescreeing bei Patienten mit Immunsuppression	18
	2.4.3 Cystische Fibrose	19
	2.5 Ziele der Arbeit	20
3	Studienkollektiv, Material und Methoden	21
	3.1 Probanden und Patienten	21
	3.2 Geräte	22
	3.3 Chemikalien und Substanzen	23
	3.3.1 Chemikalien	23
	3.3.2 Testkits	24
	3.3.3 T-Zellstimulantien und Fluorochrom-gekoppelte Antikörper	25
	3.4 Methoden	26
	3.4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) mittels Ficoll-Gradient	26
	3.4.2 Bestimmung der Zellzahl	26

3.4.3	Quantifizierung <i>M. tuberculosis</i> spezifischer CD4 T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	26
3.4.4	Quantifizierung <i>M. tuberculosis</i> spezifischer T-Zellen mittels ELISA (QuantiFERON-TB Gold in Tube-Test)	32
3.4.5	Quantifizierung <i>M. tuberculosis</i> spezifischer T-Zellen mittels ELISPOT-Assay (T-Spot.TB)	34
3.4.6	Quantifizierung <i>M. tuberculosis</i> spezifischer Antikörper mittels ELISA.....	36
3.4.7	Nachweis <i>M. tuberculosis</i> spezifischer Antikörper mittels chromatographischer Schnelltests.....	37
3.4.8	Statistische Analysen.....	37
3.4.9	Computerprogramme	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Etablierung des durchflusszytometrischen Nachweises <i>M. tuberculosis</i> spezifischer CD4 T-Zellen bei Kindern	39
4.2	Reaktivitätsvergleich bei Kindern mit Kontakt zu <i>M. tuberculosis</i>	41
4.3	Quantitative und qualitative Untersuchung der CD4 T-Zellreaktivität bei immungesunden Kindern und Erwachsenen im Altersverlauf.....	43
4.3.1	Altersabhängige Zunahme der PPD spezifischen CD4 T-Zellreaktivität bei Kindern und Erwachsenen ohne bekannten Kontakt zu <i>M. tuberculosis</i>	43
4.3.2	Nachweis einer SEB Reaktion ist in allen Altersgruppen möglich.....	44
4.3.3	Altersabhängige Zunahme in der CD4 T-Zellreaktivität gegen ESAT-6 und CFP-10....	45
4.4	CD4 T-Zellreaktivität bei gesunden im Vergleich zu chronisch kranken Kindern ohne bekannten Kontakt zu <i>M. tuberculosis</i>	47
4.5	Vergleich von Kindern und Erwachsenen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder cystischer Fibrose.....	49
4.6	Vergleichende Untersuchung der ESAT-6 und PPD Reaktivität.....	51
4.7	Serologische Testverfahren	52
4.8	Analyse des IFN γ /IL-2 Zytokinprofils Antigen spezifischer CD4 T-Zellen	53
4.9	Beispiele klinisch interessanter Fälle	55

5	Diskussion	57
5.1	Die umstrittene Anwendung von TIGRA bei Kindern unter fünf Jahren	58
5.2	Vorteile der Untersuchung der PPD Reaktivität <i>in vitro</i>	62
5.3	Dominanz der ESAT-6 Reaktivität bei Kindern	64
5.4	Die Anwendung von TIGRA bei Kindern mit cystischer Fibrose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	65
5.5	IL-2 als zusätzlicher Marker zum Reaktivitätsnachweis.....	67
5.6	Kein diagnostischer Gewinn durch die Anwendung von serologischen Tests	68
5.7	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	69
6	Abbildungsverzeichnis	70
7	Tabellenverzeichnis.....	71
8	Abkürzungsverzeichnis	71
9	Literaturverzeichnis.....	73
10	Publikationen.....	86
11	Danksagung	87

1 Zusammenfassung

Tuberkulose ist die weltweit führende, bakterielle Infektionskrankheit. Millionen Menschen sind mit Erregern des *M. tuberculosis*-Komplexes infiziert. Gerade Menschen mit einer latenten Tuberkuloseinfektion, d.h. ohne klinische Symptomatik, stellen ein großes Erregerreservoir dar. Eine wichtige Strategie zur Eindämmung der Tuberkulose weltweit ist es, solche latent Infizierte zu diagnostizieren und zu therapieren. Leider stellt sich bei nicht vorhandener klinischer Symptomatik das Problem der Diagnostik. Der lange Zeit einzig zur Verfügung stehende Test war der Tuberkulin-Haut-Test (THT). Er weist eine *in vivo* Immunantwort gegen das PPD (purified protein derivative) Antigen nach. Leider wird dieser Test von vielen Faktoren beeinflusst, beispielsweise von einer BCG (Bacille Calmette-Guérin)-Impfung oder eine Infektion mit nicht tuberkulösen Mycobakterien. In den letzten Jahren wurden jedoch *in vitro* T-Zell Interferon γ release assays entwickelt. Durch sie kann eine *M. tuberculosis* spezifische Immunantwort nachgewiesen werden, welche nicht durch eine BCG-Impfung oder einen Kontakt zu nicht tuberkulösen Mycobakterien beeinflusst wird.

Ziel dieser Arbeit war es die Anwendung eines durchflusszytometrischen T-Zell Interferon γ release assays bei Kindern und Erwachsenen zu untersuchen. Mit diesem Testverfahren werden spezifische CD4 T-Zellen gegen Tuberkulin (PPD) gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 sowie gegen die Positivkontrolle Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) durchflusszytometrisch direkt aus Vollblut nachgewiesen. Bei Erwachsenen wird dieses Verfahren schon standardisiert an der Uniklinik Homburg/Saar angewendet. Ziel war es nun, die Anwendung auch bei Gesunden und Kindern mit chronischen Erkrankungen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und cystische Fibrose zu untersuchen.

Es wurden 139 gesunde Kinder und Jugendliche bis 20 Jahre und 1563 Erwachsenen ohne Risikofaktoren für die Infektion mit *M. tuberculosis* als Kontrollgruppe untersucht. Im Vergleich dazu wurden 25 Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und 50 Kinder mit cystischer Fibrose (CF) untersucht.

Eine Reaktivität in der SEB Positivkontrolle war in 98,0% der Kinder nachweisbar, wobei jedoch Kinder unter fünf Jahren eine weniger stark ausgeprägte Immunantwort aufwiesen. Die Prävalenz einer positiven PPD Reaktion betrug bei Kindern 22,2%, im Gegensatz zu 51,2% bei Erwachsenen. Diese Prävalenz zeigte einen deutlichen altersabhängigen Anstieg,

der ab dem Alter von 15 Jahren einen konstanten Anteil von ca. 50% erreicht. Ebenso zeigte die ESAT-6 und CFP-10 Reaktivität einen altersbedingten Anstieg und wurde bei 12,6% der Kinder und 22,5% der Erwachsenen nachgewiesen. Die PPD Reaktivität bei Kindern mit cystischer Fibrose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterschied sich nicht zu der Reaktivität bei gesunden Kindern. Dies galt auch für die Reaktivität gegen ESAT-6 und CFP-10.

Diese Untersuchung belegt, dass Antigen spezifische T-Zellen sowohl bei gesunden, als auch bei chronisch erkrankten Kindern nachweisbar sind. Im Vergleich zu Erwachsenen zeigen Kinder eine signifikant geringere Immunantwort gegen das PPD Antigen. Eine Immunantwort in der Positivkontrolle lässt sich bei fast allen Kindern nachweisen, jedoch findet man bei Kindern unter fünf Jahren eine weniger stark ausgeprägte Reaktivität im Vergleich zu älteren Kindern. Dies sollte in größer angelegten Studien weiter verfolgt werden.

Summary

Tuberculosis (caused by *Mycobacterium tuberculosis*) is the world's leading bacterial infectious disease with millions of patients affected worldwide. Especially people with latent tuberculosis infection, i.e. without clinical symptoms, are a large reservoir for these pathogens. An important strategy to prevent and reduce the spread of tuberculosis in the world is to identify and successfully treat these patients. Unfortunately, since these cases present no clinical symptoms, securing the diagnosis can be problematic. For many years the tuberculin skin test was the only test available. It identifies an *in vivo* immune response against the PPD (purified protein derivative) antigen. However, this test is influenced by many factors, such as a BCG (Bacille Calmette-Guérin) vaccination or infection with non-tuberculous mycobacteria. To counter this problem an *in vitro* T-cell interferon γ release assay has been developed in recent years. This assay allows for the detection of an *M. tuberculosis*-specific immune response that is not affected by BCG vaccination or contact with non-tuberculous mycobacteria.

The aim of this study was to analyse a flow cytometric T-cell Interferon γ release assay in children and adults. This test method detects specific CD4 T-cells against tuberculin (PPD), as well as the *M. tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10. We also included a positive control, in which we performed Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) by flow cytometry from full blood samples. In adults this test is already standardized and in use at the University Hospital Homburg. We now applied this method of diagnosis to groups of healthy children and children with chronic diseases such as inflammatory bowel disease and cystic fibrosis. We examined 139 healthy children and adolescents up to 20 years of age as well as a control group which consisted of 1563 adults without risk factors for an infection with *M. tuberculosis*. In addition, we compared this data to a group of 25 children with chronic inflammatory bowel disease and a group of 50 children with cystic fibrosis.

Reactivity in the SEB positive control was detected in 98.0% of the children; however children under five years had a significantly lower immune response. The prevalence of a positive PPD reaction in children was 22.2% in contrast to 51.2% for adults. Prevalence increased in relation to the age of the patient up to a maximum of 15 years, at which point it maintained at a level of approximately 50%. ESAT-6 and CFP-10 reactivity also showed an age-related increase, detected in 12.6% of children and 22.5% of adults.

PPD reactivity in children with cystic fibrosis and chronic inflammatory bowel disease showed no difference compared to the reactivity in healthy children. This was also true for reactivity against ESAT-6 and CFP-10.

We have shown that antigen-specific T-cells in both healthy children and children with chronic diseases are detectable by the described assay. Compared to adults, children showed significantly lower immune response against the PPD antigen. Immune response in the control group could be detected in nearly all children, but children under the age of five showed significantly lower reactivity in comparison. This should be investigated further in studies of larger scale.

2 Einleitung

Die Tuberkulose ist eine der ältesten Infektionskrankheiten der Menschheit, der über Jahrhunderte Millionen Menschen zum Opfer fielen. Ein wichtiges Ereignis in der Geschichte der Tuberkulose war die Entdeckung des Erregers *Mycobacterium tuberculosis* durch Robert Koch im Jahr 1882 (HAAS et al., 2006). Einige Jahre später, 1908, wurde von Albert Calmette und Camille Guérin ein nicht virulenter Erregerstamm entwickelt, das Bacille Calmette-Guérin (BCG). Dieser BCG-Stamm wurde in Deutschland zwischen 1961 und 1998 als Impfstoff angewendet (ZWERLING et al., 2011). Die BCG-Impfung zeigt sich allerdings als Schutz vor einer Tuberkuloseinfektion bei Erwachsenen und Jugendlichen insuffizient (KAUFMANN et al., 2010).

Trotz der intensiven Forschung und der Entwicklung von effektiven Therapiemöglichkeiten ist die Tuberkulose nach wie vor die weltweit am häufigsten zum Tode führende bakterielle Infektionskrankheit, insbesondere in der Dritten Welt. Gründe hierfür sind schlechte hygienische Verhältnisse und mangelnde medizinischer Versorgung. Aber auch die Verbreitung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und dessen klinisches Erscheinungsbild AIDS begünstigen die Entwicklung einer Tuberkulose. Im Jahr 1993 wurde die Tuberkulose von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als globaler Gesundheitsnotfall ausgerufen (HAUER et al., 2008a). Dies unterstreicht die besondere Bedeutung einer frühzeitigen Diagnostik und effektiven Therapie.

2.1 Grundlagen der angeborenen und adaptiven Immunantwort

Der Verlauf einer bakteriellen Infektion wird entscheidend durch die Immunantwort des infizierten Organismus bestimmt. Das menschliche Immunsystem besitzt verschiedene Abwehrmechanismen. Man unterscheidet zwischen dem unspezifischen angeborenen sowie dem spezifischen adaptiven Immunsystem.

Unspezifische Abwehrmechanismen erfordern keine spezifische Aktivierung. Sie stehen dem Körper bereits innerhalb von Minuten nach einer Infektion zur Verfügung und können die Erregervermehrung verlangsamen. Die erste Barriere gegen infektiöse Erreger bilden die Oberflächenepithelien des Körpers. Sie bilden nicht nur eine physikalische Barriere sondern produzieren auch chemische Substanzen, die eingedrungene Keime töten (z.B. saurer pH-Wert des Magens). Wird die Epithelmembran überwunden, wird der Erreger im Gewebe durch phagozytotisch wirksame Makrophagen und neutrophile Granulozyten erkannt, aufgenommen und zerstört. Des Weiteren werden durch die Aktivierung von Makrophagen

Zytokine und andere Mediatoren freigesetzt. Diese lösen im Gewebe eine Entzündungskaskade aus, in deren Folge weitere Immunzellen zum Infektionsherd rekrutiert werden.

Neben der Auslösung dieser unspezifischen Immunreaktion kommt es zur Aufnahme von Antigenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC), v.a. dendritische Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Induktion des adaptiven Immunsystems spielen. Nach Antigenkontakt und -aufnahme wandern APC in die nächstgelegenen sekundären lymphatischen Organe, wo sie für die spezifische Aktivierung von T- und B-Zellen verantwortlich sind (JANEWAY, 2008).

Neben den Antikörper produzierenden B-Zellen zählen die im Thymus gereiften T-Lymphozyten zum zellulären Anteil des adaptiven Immunsystems. Zur Aktivierung spezifischer T-Zellen werden die Antigene von den APC als kurze Peptide in den “major histocompatibility complex“ (MHC)-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen. MHC-Moleküle der Klasse I befinden sich auf allen Körperzellen, während MHC-Moleküle der Klasse II nur auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen zu finden sind. MHC I nehmen Peptide aus intrazellulär gebildeten Proteinen auf und können somit auch Fremdpeptide von intrazellulären Erregern auf der Zelloberfläche präsentieren. Im Gegensatz dazu werden auf MHC II von außen phagozytierte und prozessierte Fremdpeptide präsentiert. Der aus MHC und Peptid gebildete Komplex wird durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zelle erkannt. Der MHC I-Komplex wird von CD8 T-Zellen erkannt, deren Hauptfunktion das Abtöten infizierter Körperzellen darstellt. Im Gegensatz dazu wird der MHC II-Komplex von CD4 Helfer T-Zellen erkannt, welche weitere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren. Bei den CD4 Helfer T-Zellen werden im wesentlichen Th1- und Th2-Zellen unterschieden, die ihre Helferfunktion nach spezifischer Erkennung in Form löslicher Moleküle ausüben. Th1-Zellen sind wichtig zur Abwehr von intrazellulären Erregern, wie z.B. *M. tuberculosis*. Sie stimulieren Makrophagen, so dass deren Funktion, die Zerstörung des eingedrungenen Erregers, effizient unterstützt wird. Th2-Zellen stimulieren die Funktion von B-Zellen, die zur effizienten Produktion von Antikörpern angeregt werden. Diese Antikörper können spezifisch an den Erreger binden und wirken entweder direkt neutralisierend oder begünstigen durch Opsonierung die Phagozytose von Erregern (JANEWAY, 2008).

Für die effiziente Aktivierung der T-Zellen durch APC sind neben der Antigen spezifischen Interaktion von MHC-Peptid Komplexen und dem TCR auch costimulatorische Signale

wichtig. Dieses Antigen unspezifisch wirksame costimulatorische Signal wird durch CD28 auf der T-Zelle sowie CD80 und CD86 auf der APC bereitgestellt. Diese Bindung induziert die Produktion und Ausschüttung löslicher Faktoren wie z.B. Interleukin 2 (IL-2). Erfolgt die Antigen-Erkennung ohne costimulatorisches Signal, kommt es zur Anergie der T-Zellen und es wird nur wenig IL-2 produziert. Erfolgt die spezifische Erkennung in Anwesenheit costimulatorischer Signale, so wird die IL-2 Produktion um das hundertfache erhöht. Die Erfordernis costimulatorischer Signale verdeutlicht die strenge Kontrolle der Immunantwort, denn nur bei einem ausreichend hohen IL-2 Spiegel erfolgt eine effiziente Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen.

Das spezifische Immunsystem bildet nach der Beseitigung des Erregers ein immunologisches Gedächtnis, welches eine Reinfektion und unkontrollierte Vermehrung mit demselben Erreger verhindert bzw. stark abschwächt. Grundlage dieses Gedächtnisses ist die Ausbildung von T- und B- Gedächtniszellen nach Antigenkontakt (JANEWAY, 2008).

2.2 Grundlagen der Tuberkulose

Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung, also etwa 2-2.5 Milliarden Menschen, ist mit *M. tuberculosis* infiziert. 5-10 Prozent der Infizierten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine behandlungsbedürftige Tuberkulose (WHO, 2010a). Weltweit spielt die zunehmende Koinfektion mit HIV eine wichtige Rolle als Risikofaktor für die Reaktivierung der Infektion (RYLANCE et al., 2010; SESTER et al., 2010; ANANDIAIAH et al., 2011). Aber auch durch Immunsuppression anderer Ursachen, z.B. Malignome (FALAGAS et al., 2010), Unterernährung (PODEWILS et al., 2011) oder auch iatrogen (SOLOVIC et al., 2010) kann die Entwicklung einer aktiven Erkrankung begünstigt werden.

2.2.1 Pathogenese der Tuberkulose

Die Erreger der Tuberkulose zählen zu den Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes, die neben *M. tuberculosis* die Erreger *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* und *M. canetti* umfassen. Tuberkulose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die am häufigsten die Lunge betrifft. Meist erfolgt die Aufnahme der Tuberkelbakterien über die Lunge, wo sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden. Mycobakterien sind in der Lage das Phagosom von Makrophagen als Lebensraum zu nutzen, indem sie den Abbauprozess, die Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom, verhindern. Dies bedingt, dass die Bakterien nicht effektiv abgetötet werden und sich im Gewebe und in den Lymphknoten ausbreiten können. Die infizierten Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen

induzieren eine T-Zell vermittelte spezifische Immunantwort. Spezifisch aktivierte CD4 T-Zellen sezernieren Zytokine. Hierbei unterstützt das Zytokin IL-2 die Proliferation weiterer Effektorzellen. Diese produzieren Interferon- γ (IFN γ), welches zur Makrophagenaktivierung von zentraler Bedeutung ist und den Tumornekrosefaktor α (TNF α), welcher weitere Makrophagen an die Infektionsstelle rekrutiert. Wenngleich Mycobakterien die Verschmelzung der Phagosomen mit lysosomalen Enzymen verhindern und somit ihrer eigenen Inaktivierung entgegenwirken, können die infizierten Makrophagen noch von zytotoxischen CD8 T-Zellen eliminiert werden. Überleben die Makrophagen diese Abwehr, wird die Ausbreitung des Erregers eingegrenzt, indem diese zu Langerhans-Riesenzellen verschmelzen, welche von aktivierten Lymphozyten umgeben sind (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2001; WALZL et al., 2011). Diese Konstellation nennt man Granulom. Die Granulombildung ist typisch für die Infektion mit Mycobakterien und wird als Versuch des Immunsystems angesehen, das Infektionsgeschehen einzugrenzen. Hierbei spielen Zytokine wie IFN γ oder TNF α eine wichtige Rolle. Man geht davon aus, dass lebende Erreger in den Granulomen verbleiben und dort jahrelang persistieren können. Bleibt diese Infektion klinisch inapparent, so spricht man von einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* (MACK et al., 2009; PAIGE, BISHAI, 2010). Durch eine Schwächung des Immunsystems kann es jedoch zu einer Reaktivierung und zur Entwicklung einer aktiven Tuberkulose kommen. Daraufhin kommt es zu einer unkontrollierten Zellzerstörung im Granulom, zentrale Verkäsung genannt. Durch die ausgedehnte Gewebeschädigung können die Erreger in die Blutbahn gelangen und sich in fast allen anderen Organen ansiedeln. Von der Lunge ausgehend können sich die Tuberkelbakterien über Tröpfcheninfektionen weiterverbreiten, was die hohe Kontagiosität der Tuberkulose bedingt (TUFARIELLO et al., 2003; JANEWAY, 2008; WALZL et al., 2011).

2.2.2 Klinik und Therapie

Nach Primärkontakt mit *M. tuberculosis* verlaufen die meisten Infektionen bei intakter Immunabwehr inapparent. Erst bei unkontrollierter Erregervermehrung und fortgeschrittenem Organbefall zeigen sich Symptome. Zu den allgemeinen Symptomen zählt der B-Symptomatik-Komplex mit subfebrilen Temperaturen, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und allgemeiner Schwäche. Als spezifischere Symptome bei Lungenbeteiligung treten Husten, Auswurf, Dyspnoe, Brustschmerz und Hämoptysen in Erscheinung (KALSDORF et al., 2008). Labordiagnostisch lassen sich eventuell Entzündungsparameter nachweisen. Zur

Diagnosesicherung stehen die radiologische Untersuchung sowie der bakteriologische Erregernachweis zur Verfügung.

Die Standardtherapie der unkomplizierten Tuberkulose beinhaltet eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika für eine Dauer von 6 Monaten. Während den ersten zwei Monate erfolgt die Gabe von Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol, gefolgt von vier weiteren Monaten Isoniazid und Rifampicin. Bei Resistenzen oder Kontraindikationen muss auf andere antituberkulostatische Medikamente zurückgegriffen werden und gegebenenfalls die Therapiedauer verlängert werden (MIGLIORI et al., 1999; SCHABERG et al., 2001; YEW et al., 2011).

2.3 Nachweis einer latenten Tuberkuloseinfektion

Unter einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* (LTBI) versteht man eine primäre Infektion mit *M. tuberculosis* in Abwesenheit klinischer Symptome und ohne radiologisch nachweisbare Lungenbeteiligung (MACK et al., 2009). Somit sind die diagnostischen Möglichkeiten stark eingeschränkt. Dennoch ist die frühzeitige Erkennung einer LTBI von großer Bedeutung, da die aktuellen Zahlen im Jahr 2009 von weltweit 9.4 Millionen Neuerkrankungen ausgehen, bei denen es sich häufig um eine Reaktivierung einer latenten Infektion handelt (WHO, 2010b). Doch durch die rechtzeitige Gabe einer präventiven Chemotherapie lässt sich die Entwicklung einer behandlungsbedürftigen Tuberkulose deutlich reduzieren. Diese Gabe besteht in der Regel aus Isoniazid (INH) über den Zeitraum von neun Monaten (MACK et al., 2009; LEUNG et al., 2011) (SCHABERG et al., 2004; CRUZ, STARKE, 2010).

Da es sich bei der LTBI um eine subklinisch verlaufende Infektion handelt, bei der kein direkter Erregernachweis erfolgen kann, sind indirekte Nachweismethoden entwickelt worden. All diese Verfahren beruhen auf einem Nachweis einer Immunität des Körpers gegen *M. tuberculosis*. Die gängigen Tests basieren auf dem Nachweis einer T-lymphozytären Immunantwort durch den Tuberkulinhauttest (s. 2.3.1) oder durch Interferon- γ Release Assays (IGRAs, s. 2.3.2).

Zusätzlich existieren serologische Nachweisverfahren, die versuchen Antikörper gegen *M. tuberculosis* nachzuweisen. Diese Verfahren sind nicht in den Leitlinien zur Diagnostik einer Tuberkulose enthalten, da ihre Anwendung aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität als Diagnostikum fraglich ist (STEINGART et al., 2007a, b; HAUER et al., 2008b; MORRIS, 2011).

2.3.1 Tuberkulinhauttest

Der Tuberkulinhauttest (THT) erfolgt durch die intracutane Injektion von gereinigtem Tuberkulin (PPD=purified protein derivative) und der Beurteilung der entstandenen Hautreaktion. Tuberkulin wird aus flüssigen Mycobakterienkulturen filtriert und wurde von Robert Koch 1890 ursprünglich zur Tuberkulose-Therapie entwickelt, was sich jedoch als ungeeignet erwies (GRADMANN, 2006). Dennoch stellte der Tuberkulinhauttest lange Zeit das einzige Diagnostikum für die LTBI dar und spielt auch heute noch eine sehr wichtige Rolle.

Der „United States PPD Standard“ wurde 1941 entwickelt. Alle neueren PPD Präparate müssen mit diesem Standard verglichen werden. Seit August 2005 ist in Deutschland das von der WHO empfohlene PPD RT23 des Statens Serum Institutes zugelassen. PPD ist eine Mischung aus über 200 verschiedenen Antigenen, welche in *M. tuberculosis*, aber auch im BCG-Komplex und in atypischen Mycobakterien (NTM=nicht tuberkulöse Mycobakterien) vorkommen (HAUER et al., 2006).

Es gibt verschiedene Applikationsmöglichkeiten, allerdings hat sich in Deutschland die Methode nach Mendel-Mantoux durchgesetzt. Bei dieser Methode wird eine definierte Menge Tuberkulin (z.B. 2 TU PPD RT23) streng intracutan an der Innenseite des Unterarms injiziert. Die hierdurch induzierte Hautreaktion basiert auf einer spezifischen lymphozytären Immunreaktion vom verzögerten hypersensitiven Typ. Das iatrogen zugeführte PPD verursacht eine Aktivierung spezifischer T-Zellen, deren Zytokinausschüttung (v.a. TNF α , IFN γ , IL-8) eine Vasodilatation und Chemotaxis anderer Immunzellen bewirkt. Folge ist eine sichtbare Rötung und Schwellung (MACK et al., 2009). Nach 48-72 Stunden wird der Durchmesser der Induration in Millimetern ausgewertet. Eine eventuell auftretende größere Rötung geht nicht in die Beurteilung des Tests mit ein (HUEBNER et al., 1993).

Die Interpretation des Tests ist sehr komplex und hängt von verschiedenen Faktoren ab, unter anderem vom Vorliegen einer BCG-Impfung oder von der individuellen Immunkompetenz (NICE, 2008). Es wurden empirisch drei verschiedene Grenzwerte für eine positive Reaktion definiert. Diese Werte orientieren sich an der Grunderkrankung bzw. am Risiko des Patienten eine aktive Tuberkulose zu entwickeln. Das höchste Risiko besteht bei Patienten mit einer Tuberkuloseanamnese, bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie und bei HIV-Patienten. Hier wird bereits eine Induration von 5 mm als positiv gewertet. Bei Immigranten aus hochendemischen Gebieten, Krankenhauspersonal, Kinder < 4 Jahren und komorbiden

Patienten wird eine Induration von 10 mm, bei Immungesunden eine Induration von 15 mm als positiv gewertet (2000; CRUZ, STARKE, 2010).

Generell zeigt der Hauttest eine vergleichsweise geringe Spezifität. So neigen BCG-Geimpfte aufgrund der Reaktivität von PPD auf Bakterien der BCG-Stämme zu einem positiven Testergebnis. Hierbei scheint die zeitliche Distanz zwischen Impfung und Durchführung des Hauttests eine wichtige Rolle zu spielen. Es hat sich gezeigt, dass ein bei Erwachsenen durchgeführter THT eher negativ ausfällt, wenn die Impfung im ersten Lebensjahr durchgeführt wurde, während in höherem Alter Geimpfte bis zu 41,8% positive THT-Ergebnisse aufweisen (FARHAT et al., 2006). Ferner ist anzunehmen, dass bei einer Reaktion ≥ 15 mm eher von einer Infektion als von einer Impfantwort auszugehen ist, wenngleich dies nach derzeitiger Datenlage nicht eindeutig belegt werden kann (WANG et al., 2002; FARHAT et al., 2006). Ebenso können positive THT-Ergebnisse durch den Kontakt zu ubiquitär vorkommenden Mycobakterien (NTM) entstehen (CRUZ, STARKE, 2010).

Wie sich durch die Kreuzreaktion mit BCG oder NTM zeigt, birgt der THT die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen. Des Weiteren können falsch negative THT durch fehlerhafte Applikation oder durch mangelnde Erfahrung bei der Interpretation vorliegen. Daher sollte der Test unter standardisierten Bedingungen nur von qualifiziertem Personal durchgeführt werden. Ebenso gibt es immunologische Gründe für ein falsch negatives Testergebnis, wie z.B. nahe zurückliegende Virusinfektionen oder Lebendimpfungen (NICE, 2008; CRUZ, STARKE, 2010). Die höchste Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse besteht allerdings bei Patienten mit eingeschränkter Immunkompetenz. Dazu gehören v.a. HIV-Patienten und Patienten unter immunsuppressiver Therapie (SESTER et al., 2006; NICE, 2008; RICHELDI et al., 2009). Aber auch bei Kindern ergeben sich häufig falsch negative Ergebnisse. Daher sollte vor allem bei Kindern unter zwei Jahren mit Expositionsrisiko trotz negativem THT eine Chemoprophylaxe durchgeführt werden (BAKIR et al., 2009).

2.3.2 T-Zell Interferon- γ Tests

In den letzten Jahren wurden IFN γ basierte Tests zur Diagnostik der LTBI entwickelt. Diese *in vitro* Diagnostika weisen die Produktion von IFN γ als Antwort auf spezifische Antigene gegen *M. tuberculosis* nach. In Abbildung 1 sind die gängigen Interferon- γ basierten Tests dargestellt. Da IFN γ hauptsächlich von CD4 T-Zellen sezerniert wird, hat sich der Ausdruck „T-cell Interferon Gamma Release Assay“ (TIGRA oder IGRA) durchgesetzt. Die dabei verwendeten Antigene, „early secretory antigenic target 6“ (ESAT-6) und „culture filtrate

protein 10“ (CFP-10), werden in der RD-1 Region codiert, die in allen Bakterien des *M. tuberculosis*-Komplexes enthalten ist. Demgegenüber weisen alle BCG-Stämme und die meisten NTM eine Deletion der entsprechenden Genregion auf (SORENSEN et al., 1995; BERTHET et al., 1998). Die Möglichkeit zur Verwendung spezifischer Antigene bei der Stimulation bedingt, dass TIGRA eine im Vergleich zum THT hohe Spezifität aufweisen, da direkt zwischen einem Kontakt zu *M. tuberculosis* und einer früheren BCG-Impfung unterschieden werden kann. Aufgrund des Mangels eines Goldstandards bei der Diagnostik der LTBI zeigt sich eine große Variabilität in Bezug auf die Spezifität und Sensitivität der IFN γ Tests. Bei der Sensitivität zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse abhängig von dem Studiendesign und der untersuchten Population, sie scheint jedoch im Vergleich zum THT in der Regel höher zu sein. Eine Metaanalyse aus dem Jahre 2008 vergleicht Studienergebnisse von Erwachsenen und zeigt eine Sensitivität zwischen 0.70-0.90 für die unterschiedlichen kommerziellen TIGRA im Vergleich zu 0.77 für den THT. Bei der Spezifität liegen die Werte zwischen 0.93–0.99 für die TIGRA und für den THT bei 0.97 in einer nicht BCG-geimpften und 0.59 in einer BCG-geimpften Population (PAI et al., 2008). Durch die Kombination von TIGRA mit THT lässt sich die Sensitivität deutlich erhöhen. Dies geht in einigen Studien allerdings mit einem Verlust der Spezifität einher (ADETIFA et al., 2010).

Bislang gibt es zwei kommerziell erhältliche TIGRA, den QuantiFERON-TB Gold in Tube® Test der Firma Cellestis und den T-SPOT.TB® Test der Firma Oxford Immunotec. Beim QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT-G-IT) Assay wird die IFN γ Konzentration stimulierter Blutproben mittels ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) aus dem Plasma bestimmt. Beim T-SPOT.TB Test wird die Anzahl IFN γ produzierender Immunzellen mittels ELISPOT-Methode nachgewiesen. Neben den beiden kommerziellen Verfahren gibt es die Möglichkeit spezifische, IFN γ produzierende CD4 T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen. Bei dieser Technik werden die Zytokine durch Zugabe eines Sekretionsinhibitors intrazellulär akkumuliert, so dass aktivierte Zellen nachfolgend mit Fluorochrom-markierten Antikörpern detektiert werden können. Im Vergleich zu den kommerziellen Verfahren bietet die Durchflusszytometrie darüber hinaus den Vorteil, dass neben der Analyse von IFN γ auch gleichzeitig andere Effektormoleküle und Zytokine erfasst werden können. Insgesamt bieten diese *in vitro* Verfahren eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem etablierten THT. Sie zeigen eine höhere klinische Praktikabilität, da der Patient nur zu einer einmaligen Blutentnahme erscheinen muss, während beim THT ein weiterer Arztbesuch nach 48-72 Stunden zum Ablesen des Testergebnisses erforderlich ist. Des Weiteren können TIGRA auch problemlos bei Patienten mit Hauterkrankungen

eingesetzt werden, bei denen der Einsatz des THTs kontraindiziert ist. Wesentliche Vorteile liegen jedoch in der erhöhten Spezifität, da falsch positive Ergebnisse bei BCG-Impfung oder NTM-Infektion durch den Einsatz der spezifischen Antigene minimiert werden können. Auch scheint es Vorteile bei der Anwendung der TIGRA bei Patienten mit eingeschränkter Immunkompetenz zu geben (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006).

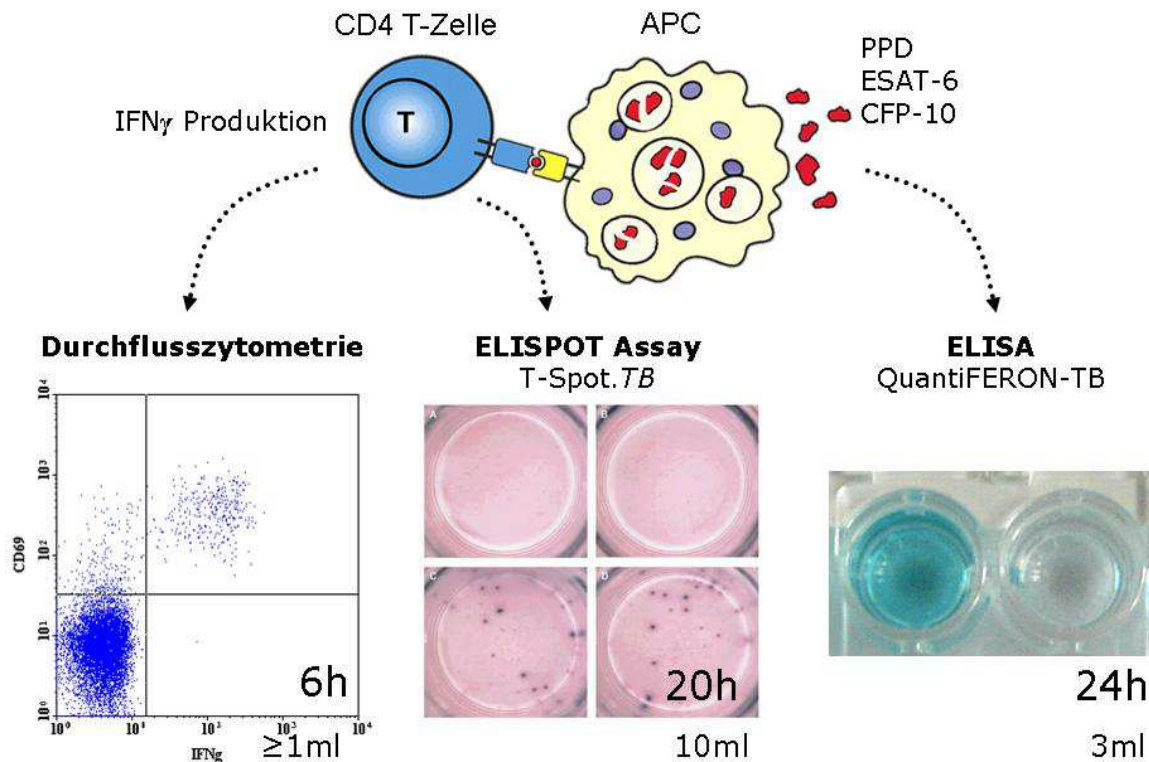


Abbildung 1: IFN γ Nachweismethoden von links nach rechts: Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrischen Messung, ELISPOT Assay und ELISA mit den jeweiligen erforderlichen Blutvolumina.

2.4 Indikationen zum Tuberkulosescreening

Ein Screening auf Hinweis eines stattgehabten Kontaktes mit *M. tuberculosis* kommt insbesondere bei Umgebungsuntersuchungen und bei Patientengruppen mit erhöhtem Risiko zur Anwendung.

2.4.1 Tuberkulosescreening bei Umgebungsuntersuchungen

Die erhöhte Spezifität bedingt, dass die Verwendung von TIGRA nun auch in den aktuellen, deutschen Richtlinien zur Durchführung von Umgebungsuntersuchungen nach Tuberkulosekontakt empfohlen wird.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist jedoch bei Kindern unter 15 Jahren noch kein Ersatz des THT durch TIGRA vorgesehen, sondern es wird empfohlen, bei allen Kindern mit einem positiven THT ein IFN γ Test zur Diagnosesicherung durchzuführen. Bei einem diskordanten

Ergebnis (THT positiv, aber IFN γ Test negativ) wird empfohlen, auf eine Chemoprophylaxe sowie eine radiologische Untersuchung zu verzichten (DIEL et al., 2007; DIEL et al., 2011c).

Das erhöhte Risiko der Entwicklung einer aktiven Tuberkulose bei Kindern spiegelt sich auch in den Empfehlungen wieder. Wenngleich TIGRA bei Erwachsenen bereits umfassend charakterisiert wurden, ist die Validität dieser *in vitro* Verfahren bei Kindern bislang eher unzureichend untersucht worden. Bei Kindern unter 5 Jahren sollte unverzüglich nach Bekanntwerden eines engen Kontakts zu einem TB-Indexfall eine Thorax-Röntgen-Untersuchung und ein THT durchgeführt sowie eine Chemoprophylaxe eingeleitet werden. Die Chemoprophylaxe beinhaltet eine Isoniazidgabe über 2 Monate. Bei einem negativen THT wird dieser nach 8-12 Wochen wiederholt. Zeigt sich weiterhin ein negatives Testergebnis wird die Chemoprophylaxe beendet. Ein positives Testergebnis wird durch einen IFN γ Test verifiziert. Ist der TIGRA zu diesem Zeitpunkt und bei einer Wiederholung nach 8-12 Wochen negativ, so wird die Chemoprophylaxe ebenfalls beendet. Bei Kindern zwischen 5 und 15 Jahren und Erwachsenen wird auf die sofortigen Chemoprophylaxe verzichtet, aber auch hier wird der IFN γ Test zur Sicherung eines positiven THT empfohlen (DIEL et al., 2007). Dies sollte aufgrund der Möglichkeit eines falsch negativen THT überdacht werden (DIEL et al., 2008; DIEL et al., 2011b).

2.4.2 Tuberkulosescreeing bei Patienten mit Immunsuppression

Bei Patienten unter Immunsuppression besteht ein erhöhtes Risiko für den Ausbruch einer aktiven Tuberkulose. Zum einen geht man von einem erhöhten Risiko der Neuinfektion aus, zum anderen besteht auch ein höheres Risiko der Reaktivierung einer LTBI. Dies betrifft sowohl Erkrankungen, die ein Verlust der Immunkompetenz verursachen, wie z.B. eine HIV-Infektion, aber auch durch Medikamente iatrogen verursachte Immunsuppression. Letztere kommt insbesondere bei Organ- und Stammzelltransplantierten zum Tragen.

Bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), mit TNF α -Blockern, wie z.B. Infliximab, besteht ein erhöhtes Risiko zur Reaktivierung einer LTBI (KEANE et al., 2001). Dies erklärt sich da TNF α ein Schlüsselzytokin bei der Abwehr von *M. tuberculosis* darstellt und zusammen mit TNF α abhängigen Zytokinen (NEWTON et al., 2008) eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Überwachung der Granulomen während einer Infektion spielt (CHAKRAVARTY et al., 2008). Aus diesem Grund wird vor Beginn einer Therapie mit TNF α -Blockern ein Screening auf LTBI empfohlen (SOLOVIC et al., 2010). Da die meisten Patienten schon vor Gabe von TNF α -Blockern unter immunsuppressiver Therapie stehen, ist

die Anwendung des THT als einziges Diagnostikum wegen der Gefahr falsch negativer Testergebnisse fraglich (MOW et al., 2004). Einige Studien zeigen tatsächlich, dass die THT-Induration bei Autoimmunerkrankungen unter TNF α -Therapie geringer bis negativ ausfällt im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (HOFFMANN et al., 2008; LALVANI, PAREEK, 2010). Im Gegensatz hierzu zeigen TIGRA eine deutlich höhere Sensitivität in dieser Patientengruppe (SESTER et al., 2006). Somit scheint es in dieser Patientengruppe sinnvoll, zum sicheren Ausschluss einer LTBI beide Tests anzuwenden (LALVANI, MILLINGTON, 2008).

2.4.3 Cystische Fibrose

Eine weitere Patientengruppe mit erhöhtem Risiko für die Infektion mit *M. tuberculosis* stellen Patienten mit cystischer Fibrose (CF) dar. CF ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit einem Defekt des CFTR-Gens, aufgrund dessen die Epithelzellmembran defekte Chloridkanäle aufweist. Dies bewirkt in allen exokrinen Drüsen die Bildung zäher Schleimsekrete. Somit sind alle Organsysteme des Körpers betroffen, wobei die Beteiligung der Lunge die größten Komplikationen birgt, da durch die zähen Schleimsekrete die mukociliäre Clearance eingeschränkt ist und der Abtransport der Sekrete verhindert wird. Dadurch bildet sich ein guter Nährboden für viele Krankheitskeime, wodurch diese Patienten besonders anfällig für sämtliche Atemwegsinfektionen sind (RATJEN, 2009). Wenngleich die Inzidenz der aktiven Infektion mit *M. tuberculosis* gering ist, erscheint ein Screening dieser Risikogruppe sinnvoll, da die Komplikationsrate und die Mortalität bei betroffenen Patienten hoch ist (ASHEROVA et al., 2006).

Auch die Infektionsrate mit atypischen, nicht tuberkulösen Mycobakterien (NTM) birgt bei Patienten mit CF eine Problematik. Einerseits besteht eine hohe Prävalenz von NTM-Infektionen bei CF-Patienten (OLIVIER et al., 2003b), andererseits ergibt sich aufgrund der Erkrankung eine höhere Progression durch NTM-Infektion (OLIVIER et al., 2003a).

2.5 Ziele der Arbeit

Die Sensitivität und Spezifität der TIGRA wurden bislang im Wesentlichen bei Erwachsenen charakterisiert. Demgegenüber ist weitestgehend unklar, inwieweit die TIGRA auch zur Anwendung bei Kindern geeignet sind. Wenngleich auch hier TIGRA dem THT überlegen zu sein scheinen (SOYSAL et al., 2008), ist die Studienlage auf diesem Gebiet noch ziemlich unzureichend. Daher sind weitere detaillierte Studien zur Anwendung der TIGRA bei Kindern erforderlich, insbesondere da durch das noch nicht vollständig ausgebildete Immunsystem bei Kindern die Erkenntnisse bei Erwachsenen nicht unbedingt übertragbar sind.

Eine detaillierte Kenntnis über die Anwendung von TIGRA bei Kindern ist nicht nur bei Umgebungsuntersuchungen relevant, sondern auch bei einer Reihe von Grunderkrankungen mit erhöhtem Infektionsrisiko, die sich bereits im Kindesalter manifestieren. Zu den klinisch relevanten Patientengruppen, bei denen ein regelmäßiges LTBI-Screening empfohlen wird, zählen Kinder mit cystischer Fibrose, transplantierte Kinder sowie Kinder mit Indikation zur Anwendung von TNF α -Blockern.

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendung der TIGRA bei Kindern zu evaluieren. Hierzu wurden immungesunde Kinder, Patienten mit cystischer Fibrose sowie Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen charakterisiert und einer großen Gruppe immungesunder Erwachsener gegenübergestellt. Als Untersuchungsmethode wurde das Durchflusszytometrie-basierte Verfahren gewählt, da bei dieser Durchführung das geringste Blutvolumen benötigt wird und zusätzlich die Möglichkeit besteht, weitere diagnostisch relevante Biomarker zu untersuchen. Des Weiteren wurde eine vergleichende Analyse der humoralen Immunantwort durchgeführt.

Folgende Fragestellungen wurden im Einzelnen verfolgt:

- Gibt es Unterschiede in der Anwendung des Tests bei immungesunden Erwachsenen und Kindern?
- Gibt es altersabhängige Unterschiede in der Reaktivität auf die verschiedenen Antigene?
- Kann der Test sowohl bei immungesunden als auch bei chronisch kranken Kindern angewendet werden?
- Welchen Vorteil bietet das Durchflusszytometrie-basierte Verfahren im Vergleich zu den kommerziellen Tests?
- Bietet die Anwendung serologischer Tests weitere Vorteile?

3 Studienkollektiv, Material und Methoden

3.1 Probanden und Patienten

In erster Linie erfolgte die Untersuchung zur Etablierung eines neuen durchflußzytometrischen TIGRA-Verfahrens zur Diagnostik einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* bei gesunden und chronisch erkrankten Kindern. Es wurden 139 immungesunde Kinder und Jugendliche bis 20 Jahre größtenteils aus der endokrinologischen Ambulanz der Universitäts-Kinderklinik Homburg/Saar rekrutiert. Im weiteren Teil dieser Arbeit werden Kinder und Jugendliche bis 20 Jahre unter der Gruppe „Kinder“ zusammengefasst. Diese Kinder wiesen als Grunderkrankung z.B. Wachstumsretardierung, M. Addison und andere Hormonstörungen auf, welche die Immunreaktion nicht bekanntermaßen beeinflusst. Die Kinder hatten keine bekannten Risikofaktoren für die Infektion mit *M. tuberculosis*. Bei allen Untersuchten erfolgte die Probengewinnung im Rahmen einer Routine-Blutuntersuchung, sodass eine zusätzliche Blutentnahme vermieden werden konnte. Das Einverständnis der Untersuchten/Erziehungsberechtigten erfolgte schriftlich nach ausführlicher Aufklärung. Ein Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes lag vor.

Es wurden fünf Blutproben von Kindern mit bekanntem Kontakt zu *M. tuberculosis* aus der Fachklinik Wangen zur Verfügung gestellt. Vier von diesen Kindern erhielten eine antituberkulotische Therapie. Des Weiteren wurden auch Voruntersuchungen sowie der klinische Verlauf übermittelt.

Zur Untersuchung von Kindern mit Risikofaktoren wurden 25 Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und 50 Kinder mit cystischer Fibrose (CF) rekrutiert. Die Proben wurden im Rahmen der vor Infliximab-Therapie empfohlenen Tuberkulose-Diagnostik gesammelt. Bei einigen Patienten wurde eine Kontrolluntersuchung im Verlauf der Erkrankung durchgeführt. Da die Leitlinien für cystische Fibrose keine regelmäßige Tuberkulosedagnostik empfehlen, wurden diese Patienten über die Vorteile einer solchen Screening-Untersuchung aufgeklärt und nahmen freiwillig an der Untersuchung teil. Zum Ausschluss altersbedingter Unterschiede wurden zusätzlich 54 Erwachsene mit CED und 11 Erwachsene mit CF untersucht.

Da ich im Rahmen meiner Labortätigkeit vom April 2008 bis Oktober 2008 auch in Routineuntersuchungen zur *M. tuberculosis* spezifischen Immunantwort Erwachsener

eingebunden war, kann zusätzlich auf eine umfassende Datenbank mit Untersuchungen Erwachsener zurückgriffen werden. Es wurden 1563 Datensätze von Erwachsenen unterschiedlicher Altersgruppen untersucht, welche im Rahmen der Tuberkulose-Diagnostik in der Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie Homburg/Saar erhoben wurden. Keiner dieser Patienten hatte bekannten Kontakt zu *M. tuberculosis* oder hatte chronische Erkrankungen wie CED und cystische Fibrose.

3.2 Geräte

Geräte	Hersteller
1,5ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim
15ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Brutschrank	Heraeus, Hamburg
Distriman	Gilson, Villiers-le-Bel
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer (FACS Canto II)	BD Biosciences, Heidelberg
Einmal-Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Kolbenhubpipetten	Gilson / Labmate, Abimed, Langenfeld
Miliquo Plus	Millipore, Schwalbach
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen
Präzisions Dispenserdips (5ml, 1,25ml)	Brand, Wertheim

Geräte	Hersteller
Sterile Werkbank, ("Clean Air" Typ DLF BSS4)	Clean Air Techniek bv, Woerden, NL
Sterile Werkbank, Tecnoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Vortex-Mixer (Reagenzglas mixer)	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge, Labofuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Megafuge	Heraeus, Hanau
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Mikroskop Nikon TMS	Nikon, Melville, USA
VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
DigiMicro 1.3 Digital Mikroskop	dnt GmbH, Dietzenbach

3.3 Chemikalien und Substanzen

3.3.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
NaN ₃	Serva, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma, Deisenhofen
bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Facs Clean	BD Biosciences, Heidelberg
Facs Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Facs Rinse	BD Biosciences, Heidelberg

Chemikalien	Hersteller
Facs Shutdown solution	BD Biosciences, Heidelberg
Fötale Kälber Serum (FCS)	Cambrex Biosciences, Verviers, Belgien
Humanes Serum Albumin (HSA)	Baxter BioScience, Heidelberg
Lysingsolution	BD Biosciences, Heidelberg
Paraformaldehyd	Aldrich-Chemie, Steinheim
PBS	Linaris, Bettingen
Saponin	Sigma, Deisenhofen
A. dest	Braun, Melsungen
FicoLite-H	Linaris, Wertheim
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
GIBCO™ AIM-V	Invitrogen Corporation, Paisley, UK

3.3.2 Testkits

Testkit	Hersteller
QuantiFERON-TB Gold in Tube	Cellestis Ltd, Carnegie, Australia
T-SPOT.TB	Oxfordimmunotec, Abingdon, UK
LIONEX TUB IgA ELISA	Lionex, Braunschweig
LIONEX TUB IgG ELISA	Lionex, Braunschweig
LIONEX TUB IgM ELISA	Lionex, Braunschweig
TB-GAM Rapid Tuberculosis Test	Lionex, Braunschweig
TB-ST Tuberculosis Rapid Test	Lionex, Braunschweig

3.3.3 T-Zellstimulantien und Fluorochrom-gekoppelte Antikörper

Tabelle 1 fasst die Reagenzien zusammen, die zur Stimulation Antigen spezifischer T-Zellen eingesetzt wurden.

Tabelle 1: Reagenzien zur Stimulation spezifischer T-Zellen

Stimulans	Klon	Konzentration	Firma/Quelle
α CD28	L293	1 μ g/ml	BD Biosciences, Heidelberg
α CD49d	9F10	1 μ g/ml	BD Biosciences, Heidelberg
PPD		1mg/ml	Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark
ESAT-6		0,5mg/ml	Lionex, Braunschweig
CFP-10		0,5mg/ml	Lionex, Braunschweig
SEB		2,5 μ g/ml	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 2 fasst die Antikörper zusammen, die zur durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellen verwendet wurden. Bei allen Antikörpern handelt es sich um murine Antikörper, die humane Antigene erkennen.

Tabelle 2: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von T-Zellen

Antikörper (-Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma
CD4 APC	SK3	IgG1 k	BD-Biosciences
CD69-PerCP	L78	IgG1	BD-Biosciences
IL-2 PE	MQ1-17H12	IgG2a	BD-Biosciences
IFN γ FITC	4S.B3	IgG1 k	BD-Biosciences

3.4 Methoden

3.4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) mittels Ficoll-Gradient

Die Isolierung der PBMC wird mittels Ficoll Gradient durchgeführt. Hierzu werden heparinisierte Blutproben (max 12 ml) steril in 50 ml Falcons umgefüllt, bis 35 ml mit PBS aufgefüllt und anschließend gemischt. Nach der vorsichtigen Unterschichtung mit 13 ml FicoLite-H wird die Probe für 20 min bei 2500 UPM ohne Bremse zentrifugiert. Daraufhin kann die Intermediärschicht zwischen Plasma und Ficollschicht mittels einer 5 ml Pipette abpipettiert und in ein neues 50 ml Falcon überführt werden. Diese Intermediärschicht enthält die PBMC.

Die Zellen werden nun zweimal gewaschen, dies erfolgt jeweils durch Auffüllen mit RPMI 1640 und anschließende Zentrifugation mit Bremse, das erste Mal mit 1800 UPM und das zweite Mal mit 1200 UPM für 10 jeweils Minuten. Anschließend wird das Pellet in AIM-V-Medium aufgenommen.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer. Die Zählkammer ist in vier Quadranten unterteilt, welche jeweils aus 16 Einzelquadranten bestehen. Es werden je zwei gegenüberliegende Quadranten ausgezählt, zu denen die gesamten 16 Einzelquadranten und 2 Außenränder gehören. Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit 3% Essigsäure angefertigt. Es werden 10 µl dieser Zellsuspension in die Zählkammer gegeben. Die Anzahl der Zellen pro ml errechnet sich aus dem Mittelwert der Zellzahl beider Quadranten multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Kammerfaktor 10.000. Die Gesamtzellzahl in der Suspension ergibt sich aus Zellzahl pro ml multipliziert mit dem Volumen des Zellmediums. Die Zellsuspensionen können nun auf eine beliebige Konzentration eingestellt werden.

3.4.3 Quantifizierung *M. tuberculosis* spezifischer CD4 T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse von Antigen spezifischen CD4 T-Zellen mittels Durchflusszytometrie werden spezifische T-Zellen durch Antigenstimulation zur Aktivierung und Zytokinproduktion angeregt. Anschließend kann die Anzahl der angeregten Zellen über Fluorochrom-markierte Antikörper nachgewiesen werden. Für die Untersuchung *M. tuberculosis* spezifischer CD4 T-Zellen werden die Antigene PPD, ESAT-6 und CFP-10 herangezogen. Als

Negativkontrolle, mit der Hintergrundsignale sowie unspezifisch reagierende T-Zellen erfasst werden können, dient das Lösungsmittel PBS. Als Positivkontrolle dient *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB), da es direkt an eine Reihe von V β -Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors bindet und somit eine breite Zytokinproduktion bei jedem Probanden hervorruft.

Die Methode wird in drei Schritte gegliedert. Die Stimulation Antigen spezifischer T-Zellen aus Vollblut, deren Färbung mit spezifischen Antikörpern und anschließendem durchflusszytometrischem Nachweis.

Stimulation

Die Stimulation kann direkt aus Vollblut durchgeführt werden. Zunächst wird das heparinisierte Vollblut mit CD28 und CD49d spezifischen Antikörpern in einer Konzentration von je 1 μ g/ml gemischt. Die Bindung dieser Antikörper begünstigt die Costimulation sowie die Zell-Zell-Interaktion zwischen Antigen-präsentierender Zelle (APC) und T-Zelle (WALDROP et al., 1998). Danach wird das Vollblut zur Durchführung der spezifischen Stimulation auf einzelne Röhrchen verteilt. Das eingesetzte Volumen pro Stimulationsansatz richtet sich nach der erwarteten Frequenz reaktiver T-Zellen und nach der Anzahl der anschließend vorgesehenen durchflusszytometrischen Färbungen. Für die Stimulation mit PBS, PPD und SEB wird bei der Untersuchung je 450 μ l (ausreichend für zwei Färbungen) und für die Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 je 300 μ l eingesetzt (ausreichend für eine Färbung). Es folgt die Zugabe der Antigene. Die Konzentrationen können Tabelle 3 entnommen werden. Während der 6-stündigen Inkubationszeit (37°C, 6% CO₂) werden die spezifischen T-Zellen aktiviert und produzieren Zytokine, beispielsweise IFN γ . Nach 2 Stunden wird die Exozytose der Zytokine durch Zugabe von 10 μ g/ml Brefeldin A (BFA) gestoppt, um die Zytokine intrazellulär zu akkumulieren. Es folgt weitere 4 Stunden Inkubation.

Die Stimulation wird nach 6 Stunden abgestoppt und die Zellen werden fixiert. Um Zell-Zell-Interaktionen sowie die Adhäsion von Zellen an der Röhrchenoberfläche aufzuheben, wird in jede Probe 2mM EDTA (aus 20 mM Stocklösung) zugefügt, 10 Sekunden gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierung der weißen Blutzellen und Lyse der Erythrozyten erfolgt mit 9 ml Becton Dickinson Lysingsolution pro ml Vollblut während einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 1300 UPM) und dem Absaugen des Überstandes wird das entstandene Zellpellet mit 2 ml FACS-Puffer (PBS-5%FCS-0,5%BSA-0,07%NaN₃) gewaschen. Dies erfolgt durch Zugabe des FACS-Puffers, anschließendem Zentrifugieren (10 Minuten bei 1300 UPM) und

durch Absaugen des Überstandes. In der Praxis hat sich gezeigt, dass es sinnvoll ist, das Röhrchen vor jedem Waschvorgang über ein Gitter zu ziehen, um das Pellet vor dem Resuspendieren aufzulockern. Abschließend wird das Pellet in je 200 µl FACS-Puffer pro Färbung aufgenommen (450µl Vollblut bei PPD und SEB Stimulation ergeben zwei, 300µl bei ESAT-6 oder CFP-10 Stimulation eine Färbung). Die Zellen können nun direkt gefärbt werden oder auch über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Tabelle 3: Konzentration der Antigene

Antigen	Konzentration	Stock-Konzentration
PBS	Volumen wie bei PPD	
PPD	7,32 µg/ml	1 mg/ml
ESAT-6	10 µg/ml	0,32 mg/ml
CFP-10	10 µg/ml	0,32 mg/ml
SEB	2,5 µg/ml	1 mg/ml

Färbung

Zur Färbung der stimulierten Zellen mit spezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern (AK) werden diese auf FACS-Röhrchen umverteilt. Je nach erwarteter Frequenz Antigen spezifischer T-Zellen werden Leukozyten aus ca. 225-300 µl Vollblut verwendet. Pro Probe werden zunächst 2 ml Saponin (SAP)-Puffer (FACS-Puffer/0.1% Saponin) für 10 min zugefügt. Dies verursacht eine Permeabilisierung der Membran, die das Erreichen der Zytokine im Zellinneren durch spezifische AK ermöglicht. Nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 1300 UPM) und dem Absaugen des SAP-Puffers erfolgt die Zugabe der AK-Mischung in einem Gesamtvolumen von je 50 µl pro Probe. Die einzelnen AK-Konzentrationen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Der AK-Mischung wird ebenfalls 0.1% Saponin hinzugefügt und mit FACS-Puffer auf 50 µl aufgefüllt. Da die Fluorochrom-konjugierten Antikörper lichtempfindlich sind, erfolgt die 30 minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Zellen mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Zuletzt wird das Zellpellet in 150 µl 1% Paraformaldehydlösung (PFA) aufgenommen. Dies dient der endgültigen Fixierung der spezifisch angefärbten Zellen bis zur Messung. Die Proben sind nun bereit für die Messung

am Durchflusszytometer. Bis zur Messung können die Proben über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Der gesamte Zeitaufwand beträgt 6 Stunden Inkubation (davon 20 Minuten aktive Arbeitszeit), ca. eine Stunde Fixierung (25 min Arbeitszeit) und ca. eine Stunde Färbung (25 min Arbeitszeit). Pro Probe kommen noch 3 Minuten Messungs- und Auswertungszeit hinzu. Dies ergibt eine Gesamtarbeitszeit von ca. 73 Minuten pro Probe.

Tabelle 4: Konzentration der Antikörper

Antikörper	Probenanzahl	Vollblut-Menge pro Probe	AK-Menge
CD4 APC	1	225-300 µl	0,5 µl
CD69 PerCP	1	225-300 µl	2 µl
IFN γ FITC	1	225-300 µl	0,5 µl
IL-2 PE	1	225-300 µl	2 µl

Die zugegebene AK-Menge ist mittels Verdünnungsreihe bestimmt worden und kann von den Herstellerangaben abweichen.

Durchflusszytometrische Messung und Auswertung

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse der Zellen auf der Basis lichtbrechender und fluoreszierender Eigenschaften in einem Flüssigkeitsstrom. FACS ist ein Synonym für diese Methode und steht für **fluorescence activated cell sorting**.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen der Zellen beim Passieren eines Laserstrahls. Die in der Probe befindlichen Zellen werden von einer Kapillare angesaugt und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Hierbei wird das Licht gemäß der Größe und Beschaffenheit der Zelle gestreut und mittels spezieller Detektoren erfasst. Man unterscheidet zwischen Vorwärtsstreulicht (FCS=Forward Scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC=Side Scatter). Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Beugung des Lichts und gibt Auskunft über die Größe und das Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts und hängt von der Granularität (Struktur des Zellkerns, Vesikel, etc.) der Zelle ab. Anhand von Abbildung 2 wird deutlich, dass sich die prominenten Blutzellpopulationen bereits anhand lichtbrechender Eigenschaften einfach identifizieren lassen.

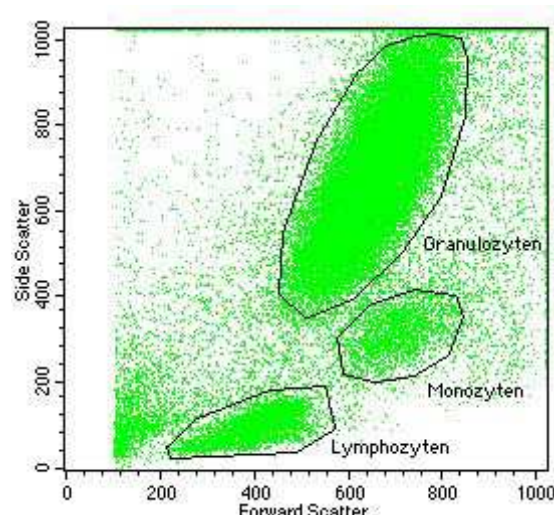


Abbildung 2: Dotplot Darstellung der lichtbrechenden Eigenschaften von Blutzellen. Aufgetragen sind Forward Scatter (Zellgröße) gegen Side Scatter (Granularität) einer Messung direkt aus Vollblut.

Für die weitere Spezifizierung der Zellen, z. B. die Aufteilung der Lymphozyten in CD4 und CD69 positive T-Zellen, werden die Zellpopulationen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Es können sowohl membranständige Oberflächenmoleküle als auch, nach der Permeabilisierung der Membran, intrazelluläre Antigene wie beispielsweise Zytokine nachgewiesen werden.

Durch den Einsatz mehrerer Laser kann die Anzahl der eingesetzten Farbstoffe erhöht und somit mehr Informationen gewonnen werden. Zu Beginn erfolgte die Auswertung mit dem Durchflusszytometriergerät FACS Calibur der Firma BD Biosciences. Im weiteren Verlauf wurde die Analyse auf einem FACS Canto II Gerät durchgeführt, das eine Analyse von bis zu 6 Fluorochromen erlaubt. Die verwendeten Fluorochrome mit entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Anregungswellenlänge (nm)	Maximum der Emissionswellenlänge (nm)
FITC	495	520
APC	650	660
PE	480	578
PerCP	490	675

Zur Darstellung der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen wird die „DotPlot“-Darstellung verwendet. Dabei wird jede Zelle entsprechend ihrer lichtbrechenden und/oder fluoreszierenden Eigenschaften als Punkt dargestellt, wobei zwei unterschiedliche Parameter auf der x- und y-Achse aufgetragen werden. Die hier angewendete Gating-Strategie ist in Abbildung 3 dargestellt. Über die beiden Parameter Vorwärts- und Seitwärts-Scatter lassen sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, Leukozytenpopulationen identifizieren. Abbildung 3A stellt Zellen nach Permeabilisierung mit Saponin dar. Durch diese Verarbeitung nehmen Monozyten und Granulozyten ähnliche lichtbrechende Eigenschaften an, die Region der Lymphozyten lässt sich jedoch noch deutlich abgrenzen. In Abbildung 3B sind nun ausschließlich Zellen aus dieser Region dargestellt, also Lymphozyten, unter denen sich die CD4 T-Zellen durch CD4 APC-Fluoreszenz weiter identifizieren lassen. Es werden im Weiteren nur noch CD4 positive Lymphozyten, sowohl IFN γ negative als auch IFN γ positive, betrachtet. In Abbildung 3C werden die CD4 T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD69 und IFN γ dargestellt. CD69 dient als zusätzlicher Marker für den Aktivierungsstand der T-Zelle. Als Antigen spezifisch werden CD69 und IFN γ doppelt positive CD4 T-Zellen im rechten oberen Quadranten gewertet. Im vorliegenden Beispiel, bei dem das Vollblut eines Probanden mit PPD Antigen stimuliert wurde, waren 1.18 % aller CD4 T-Zellen spezifisch gegen PPD gerichtet. In ähnlicher Weise werden Zellen quantifiziert, die das Zytokin IL-2 produzieren. Durch gleichzeitige Färbung beider Zytokine können folglich auch Zellen identifiziert werden, die beide Zytokine gleichzeitig bzw. nur je eines der beiden Zytokine produzieren. Ab einem Prozentsatz von ≥ 0.05 % spezifischer T-Zellen, abzüglich der Frequenz in der Negativkontrolle, wird von einer positiven Immunantwort gegen das verwendete Antigen ausgegangen.

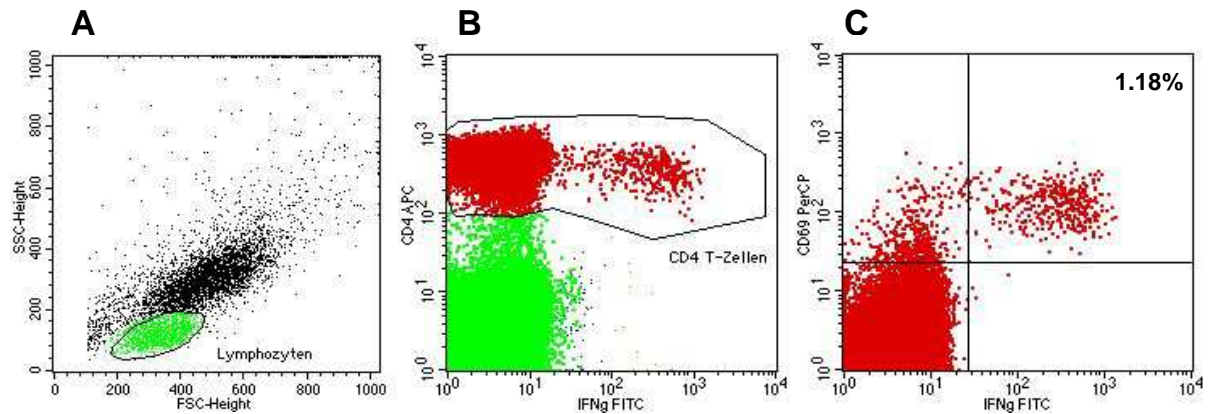


Abbildung 3: Gating-Strategie zur Identifizierung Antigen spezifischer CD4 T-Zellen A: Anhand des Forward Scatter (FSC) und des Side Scatter (SSC) werden die Leukozyten über ihre Größe und Granularität in Populationen eingeteilt. Die grün markierte Region definiert Lymphozyten, die in B hinsichtlich ihrer Expression von CD4 und IFN γ aufgetragen sind. Eine weitere Region (rot) wird nun so gelegt, dass alle CD4 positiven Lymphozyten erfasst werden. C: Zur Identifizierung Antigen spezifischer CD4 T-Zellen wird CD69 gegen IFN γ aufgetragen und der prozentuale Anteil doppelt-positiver Zellen ermittelt (in diesem Beispiel 1.18%).

3.4.4 Quantifizierung *M. tuberculosis* spezifischer T-Zellen mittels ELISA (QuantiFERON-TB Gold in Tube-Test)

Der QuantiFERON-TB Gold in Tube-Test (QFT-G-IT) ist ein weiterer Test zur *in vitro*-Diagnostik einer Immunreaktion gegen *M. tuberculosis* und wurde nach den Angaben des Herstellers Cellestis durchgeführt. Die Zellen aus heparinisiertem Vollblut werden mit einem Peptidcocktail aus den Proteinen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) stimuliert. Hiernach erfolgt der Nachweis von Antigen spezifisch sezerniertem IFN γ aus dem Plasma der Probe durch die ELISA (enzyme linked immunosorbant assay)-Methode. Bei dieser Methode sind spezifische Antikörper gegen IFN γ an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden. Im Plasma vorhandenes IFN γ wird gebunden und über einen Enzym-markierten Zweit-Antikörper nachgewiesen, dessen Bindung durch die Zugabe eines zum Enzym passenden Substrates visualisiert wird. Meistens handelt es sich bei dem Enzym um Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase. Zur quantitativen Bestimmung der IFN γ Konzentration wird eine Standardkurve mit bekannter Antigenkonzentration angefertigt.

Die Blutentnahme zur Durchführung des QuantiFERON-TB Gold in Tube -TB Tests erfolgt in die im Kit vorhandenen Röhrchen. Pro Patient umfasst diese eine Negativkontrolle, ein Röhrchen mit TB spezifischen Antigenen und eine Mitogenkontrolle (Phytohämagglutinin, PHA), die als Positivkontrolle dient. Die Antigene befinden sich in lyophilisierter Form an der Innenwand der Röhrchen. In jedes Röhrchen wird 1 ml venöses Blut gefüllt und anschließend sorgfältig gemischt, um die im Röhrchen lyophilisiert vorliegenden Peptid-Antigene komplett mit der Blutprobe zu vermischen. Nun werden die Röhrchen schnellstmöglich, spätestens jedoch innerhalb von 16 Stunden, stehend für 16-24 Stunden bei

37°C inkubiert. CO₂ und Befeuchtung sind nicht nötig. Im Anschluss werden die Proben für 5-15 Minuten bei 1500-2200g zur Gewinnung des Zytokin-haltigen Plasmas zentrifugiert. Das Plasma kann entweder direkt zur Messung der Zytokine in die ELISA-Platte überführt werden oder bis zu 8 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.

Die Bestimmung der IFN γ Konzentration der Plasmaproben erfolgt mit Hilfe der im Testkit vorhandenen Reagenzien nach Angaben des Herstellers. Zu Beginn der ELISA-Messung werden die Plasmaproben und alle Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht. Für jede ELISA-Mikrotiterplatte wird eine Standardkurve mit rekombinatem Human-IFN γ erstellt. Dazu wird der lyophilisierte Kitstandard mit destilliertem Wasser rekonstituiert, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 8,0 IE/ml entsteht. Dieser Kitstandard wird nun zur Herstellung einer 1:4 Verdünnungsserie von IFN γ in grüner Verdünnungslösung verwendet. Der Standard S1 enthält 4 IE/ml, S2 1 IE/ml, S3 0,25 IE/ml und S4 enthält 0 IE/ml (nur Verdünnungslösung). Die Standards werden mindestens doppelt getestet. Zur Verdünnung der Proben und Standards wird das lyophilisierte 100x Konjugat, ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter IFN γ AK, mit 0,3 ml destilliertem Wasser rekonstituiert und anschließend eine 1%iger Konjugatlösung mit grüner Verdünnungslösung hergestellt. Nun werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 50 μ l Konjugatlösung vorgelegt und daraufhin 50 μ l der Plasmaproben bzw. je 50 μ l der Standards 1-4 hinzupipettiert. Konjugat und Proben werden nun, indem man die Mikrotiterplatte vorsichtig schwenkt, sorgfältig für 1 Minute gemischt und für 120 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit wird der Waschpuffer aus 20x Waschpufferkonzentrat und A. dest. hergestellt. Nach der Inkubationszeit wird jede Vertiefung mindestens 6-mal mit 400 μ l Waschpuffer gewaschen. Die Platten werden auf einem Papiertuch ausgeklopft, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Nun gibt man 100 μ l Enzymsubstratlösung in alle Vertiefungen und inkubiert 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die im Anschluss hinzuzufügende Stopplösung sollte in etwa gleichem Tempo in die Vertiefungen eingebracht werden wie das zuvor hinzugefügte Substrat. Die Messung der optischen Dichte jeder Vertiefung muss innerhalb 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung erfolgen, mit Hilfe eines ELISA-Reader unter Verwendung eines 450 nm-Filters und eines 620 bis 650 nm-Referenzfilters. Für die Auswertung der Rohdaten und die Berechnung der Ergebnisse wurde die Analysesoftware des Herstellers verwendet. Zur Interpretation der Testergebnisse gibt es genaue Herstellerangaben, welche Tabelle 6 zu entnehmen sind.

Tabelle 6: Interpretation der QuantiFERON-TB Gold in Tube-Test Ergebnisse

Null [IE/ml]	Tb-Antigen minus Null [IE/ml]	Mitogen minus Null [IE/ ml]	Ergebnis
≤ 8.0	< 0.35	$\geq 0,5$	Negativ
	≥ 0.35 und < 25 % des Null-Wertes	$\geq 0,5$	Negativ
	≥ 0.35 und ≥ 25 % des Null-Wertes	beliebig	Positiv
> 8.0	$< 0,35$	$< 0,5$	Unschlüssig
	$\geq 0,35$ und $< 25\%$ des Null-Wertes	$< 0,5$	
	beliebig	beliebig	

3.4.5 Quantifizierung *M. tuberculosis* spezifischer T-Zellen mittels ELISPOT-Assay (T-Spot.TB)

Der T-SPOT.TB Test ist ein weiterer Test zur *in vitro*-Diagnostik einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* und wurde nach den Angaben des Herstellers Oxford Immunotec durchgeführt. Bei diesem Test werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Vollblut isoliert und mit spezifischen Antigenen gegen *M. tuberculosis* (ESAT-6 und CFP-10) inkubiert. Mithilfe der ELISPOT (Enzyme Linked Immuno Spot)-Methode können spezifisch stimulierte Zellen als Spots ausgezählt werden. Der ELISPOT Assay misst lokal freigesetztes IFN γ einzelner Immunzellen durch den Einsatz IFN γ bindender Antikörper, die an die Membran einer Mikrotiterplatte gebunden sind. Durch ein farbsubstratumsetzendes Enzym, hier alkalische Phosphatase, welches wiederum an einen 2. Antikörper gekoppelt ist, wird das lokal gebundene IFN γ nach Zugabe des Substrates, hier 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz, als farbiger Spot sichtbar. Durch den begrenzten Diffusionsradius des exozytierten IFN γ der Zelle können Antigen spezifisch stimulierte Zellen als einzelne Spots am Plattenboden identifiziert und ausgezählt werden.

Zur Durchführung des Testes sollte das Vollblut in Blutentnahmeröhrchen mit Heparin als Antikoagulanzen entnommen werden. Das benötigte Blutvolumen richtet sich nach dem Alter und Immunstatus des zu untersuchenden Probanden. Für immunkompetente Erwachsene und

Kinder über 10 Jahren werden 8 ml venösen Blutes gebraucht, bei Kindern zwischen 2 und 9 Jahren sind 4 ml und bei Kindern bis 2 Jahren und Neugeborene sind 2 ml ausreichend. Bei stark immunsupprimierten Patienten sollten 16 ml abgenommen werden. Das Blut sollte am Tag der Blutentnahme verarbeitet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Pro Messung werden 1×10^6 PBMC benötigt.

Die Isolierung der PBMC erfolgt mittels Ficoll-Gradient, dabei werden die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte auf verschiedene Schichten verteilt (siehe 3.4.1). Die trübe Schicht der PBMC kann somit abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt werden. Danach werden die PBMC zweimal mit serumfreien Medium (RPMI 1640) gewaschen, um freie Zytokine zu entfernen. Nach Anweisungen des Herstellers werden die gewaschenen Zellen in 700 µl AIM-V-Medium resuspendiert. Im Anschluss werden die PBMC mittels Neubauer Zählkammer gezählt und eine Endverdünnung von 250000 Zellen/100 µl hergestellt (siehe 3.4.2).

Es werden 4 Vertiefungen pro Patientenprobe benötigt: Negativkontrolle (AIM-V Medium), Panel A (ESAT-6), Panel B (CFP-10) und eine Positivkontrolle (PHA). Diese Antigene werden in einem Volumen von 50 µl (Konzentration ist aus Herstellerangaben nicht ersichtlich) in die Platte pipettiert. Hierbei muss sichergestellt sein, dass die gesamte Oberfläche der Membran mit Reagenzien benetzt ist. Anschließend werden je 100 µl Zellsuspension der Patientenprobe in die vier Vertiefungen pipettiert. Danach werden die Platten für 16-20 Stunden (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Währendessen dürfen die Platten nicht mehr bewegt werden. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Vertiefungen viermal mit je 200 µl PBS gewaschen und im Anschluss wird je 50 µl Konjugatreagenz hinzugefügt. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 2-8°C. Nun werden die Platten wiederum viermal mit PBS gewaschen und je 50 µl Substrat in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von exakt 7 Minuten bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch viermaliges Waschen im A. dest. Abgestoppt. Die Platten sollten vor dem Auszählen der Spots gut getrocknet werden (z.B. über Nacht bei Raumtemperatur). Bei der Auswertung werden nur scharfe, dunkelblaue Spots auf der Membran eines jeden Wells gezählt. Die Spots sind mit bloßem Auge sichtbar, zur Auszählung sollte jedoch ein Vergrößerungsglas, ein geeignetes Mikroskop oder ein ELISPOT Plattenlesegerät verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Digital-Mikroskopes (DigiMicro 1.3).

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Ein positives Testergebnis ist abhängig von der Spotanzahl in der Nil-Kontrolle und der Positivkontrolle.

Bei 0-5 Spots in der Nil-Kontrolle sollte die Anzahl der Spots in Panel A oder Panel B die Nil-Kontrolle um mindestens 6 Spots übersteigen. Bei 6-10 Spots in der Nil-Kontrolle sollten in Panel A oder B mindestens doppelt so viele Spots enthalten sein. Bei mehr als 10 Spots in der Nil-Kontrolle oder weniger als 20 Spots in der Positivkontrolle gilt der Test als unschlüssig und sollte wiederholt werden. In Abbildung 4 ist ein Beispiel für ein typisch positives Testergebnis zu sehen.

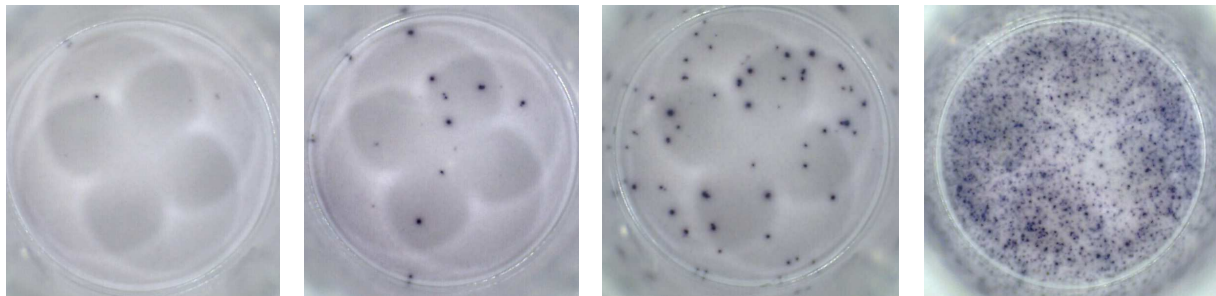


Abbildung 4: Typisches Ergebnis eines positiven T-SPOT.TB Tests: Von links nach rechts: Negativkontrolle „NIL“ (1 Spot), Panel A (13 Spots), Panel B (54 Spots), PHA (>250 Spots).

3.4.6 Quantifizierung *M. tuberculosis* spezifischer Antikörper mittels ELISA

Die Firma Lionex bietet verschiedene *in vitro*-Diagnostik ELISA Test Kits zum Nachweis von Antikörpern gegen *M. tuberculosis* an. Hier wurden ELISA Kits zum Nachweis *M. tuberculosis* spezifischer Antikörper der Klassen IgG, IgM und IgA angewendet (Lionex Tub IgA/IgG/IgM ELISA). Die Durchführung fand anhand der Angaben des Herstellers Lionex statt. Das ELISA-Prinzip ist in Abschnitt 3.4.4 erläutert. Auch hier erfolgt der Nachweis von Antikörpern gegen *M. tuberculosis* über spezifische rekombinante Antigene, die auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden sind. Die Bestimmung der Antikörper erfolgt aus der Heparin-Plasma Probe, die nach Entnahme des Vollblutes für die T-Zell-Stimulation abzentrifugiert wurde. Während der 45-minütigen Inkubationszeit binden die in den Proben enthaltenen spezifischen Antikörper an die fest gebundenen Antigene. Durch anschließendes Waschen wird nicht gebundenes Material entfernt. Peroxidase-gekoppelte Antikörper erkennen die gebundenen Antikörper und können über die Zugabe des passenden Substrats als Farbumschlag sichtbar gemacht werden. Durch den nachgewiesenen Farbumschlag kann auf die Menge an produzierten Antikörpern rückgeschlossen werden. Die Normierung erfolgt anhand einer Standardkurve, die über die gemessenen OD-Werte der Standards mit definierten AK-Mengen (Werte von 0 bis 5) erstellt wird. In dieser Arbeit wurden die Messwerte der einzelnen Proben anhand einer linearen Regression mittels Prism-Software ermittelt. Als positive Reaktion wurde eine gleiche oder höhere optische Dichte (OD) der Probe im Vergleich zu Standard 3 festgelegt.

3.4.7 Nachweis *M. tuberculosis* spezifischer Antikörper mittels chromatographischer Schnelltests

Zum qualitativen Nachweis *M. tuberculosis* spezifischer Antikörper wurden Antikörper-Schnelltests der Firma Lionex angewendet. Es kamen der TB-ST Tuberculosis Rapid Test zum Nachweis einer aktiven Tuberkulose sowie der TB-GAM Rapid Tuberculosis Test zum Nachweis *M. tuberculosis* spezifischer IgG, IgA und IgM Antikörper zur Anwendung. Alle Tests wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wird in die mit S markierte Vertiefung der Kassette je 20 µl des Patientenplasmas gegeben und anschließend 2 (TB-ST) bzw. 3 (TB-GAM) Tropfen des Verdünnungspuffers hinzugefügt. Stark positive Ergebnisse können nach 10 Minuten abgelesen werden, schwach positive nach 15 Minuten (TB-ST) bzw. 25 Minuten (TB-GAM). C zeigt in beiden Tests den Kontrollstreifen an, während T das eigentliche Testergebnis anzeigt. In Abbildung 16E sind beide beschriebenen Schnelltest dargestellt.

3.4.8 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung dieser Untersuchung erfolgte mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 5.0. Die quantitative Analyse der T-Zell Reaktivität in unterschiedlichen Altersgruppen wurde in der Regel mittels Kruskal-Wallis Test analysiert. Bei Signifikanzen wurden die einzelnen Untergruppen mittels Dunn's Multiple Comparison Test verglichen. Generell wurden die Frequenzen Antigen reaktiver T-Zellen in den Gruppen anhand des Medians (MD), der Spannbreite (range=r), sowie der Patientenzahl (n) charakterisiert.

Die qualitative Analyse der Gruppen erfolgte mittels Chi-square-Test.

Die Analyse des IFN γ /IL-2 Zytokinprofils erfolgte durch „One-way analysis of variance“ mit nachfolgendem Bonferroni's Multiple Comparison Test.

3.4.9 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme kamen zum Einsatz:

Programm	Verwendung
Microsoft Office Word 2003	Textverarbeitung
Microsoft Office Exel 2003	statistische Auswertung
GraphPad Prism 5.0	statistische Auswertung, graphische Darstellung
EndNote X.0.2	Literaturverwaltung
PowerPoint 2003	graphische Darstellung
Microsoft Office Access 2003	Datenverwaltung
CellQuest Pro	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten
BD FacsDiva	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des durchflusszytometrischen Nachweises *M. tuberculosis* spezifischer CD4 T-Zellen bei Kindern

Zu Beginn der Arbeit wurde das bei Erwachsenen bereits etablierte Testverfahren zum Nachweis *M. tuberculosis* spezifischer CD4 T-Zellen bei Kindern evaluiert. Hierzu wurden zunächst Kinder und Jugendliche unter 20 Jahren mit aktiver Tuberkulose, nach erfolgreicher Behandlung und Patienten ohne bekannten Kontakt zu *M. tuberculosis* untersucht. Abbildung 5 zeigt jeweils eine typische Dotplot-Darstellung eines Patienten aus der jeweiligen Gruppe. Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil reaktiver CD4 Zellen nach Stimulation mit der PBS Negativkontrolle, PPD, ESAT-6, CFP-10 sowie der Positivkontrolle SEB. In Abbildung 5A ist ein typisches Beispiel eines Kindes mit klinisch nachgewiesener aktiver Tuberkulose dargestellt (#3, Tabelle 7). Auf das PPD Antigen reagierten 1.01% aller CD4 T-Zellen, auf die für *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 reagierten 0.22% und 0.41% der CD4 T-Zellen, während der Anteil reaktiver T-Zellen in der PBS Negativkontrolle mit 0.02% unter der Nachweisgrenze lag (0.05%). In der Positivkontrolle war ebenfalls eine hohe Frequenz reaktiver CD4 T-Zellen detektierbar (3.47%). Da sowohl das PPD, als auch beide *M. tuberculosis* spezifischen Antigene eine positive Reaktion aufwiesen, konnte der klinische und mikrobiologische Befund einer aktiven Infektion mit *M. tuberculosis* auch auf immunologischer Basis bestätigt werden.

Abbildung 5B zeigt ein typisches Beispiel eines Kindes mit erfolgreich behandelter aktiver Tuberkulose (#8, Tabelle 7). In diesem Beispiel betrug der Anteil reaktiver CD4 Zellen in der Negativkontrolle 0.03%. In der PPD Probe reagierten 1.74 % der Zellen, auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 Antigene reagierten je 0.36% und 0.39%. Auch bei diesem Probanden lag die SEB Antwort mit 2.48% deutlich über der Nachweisgrenze von 0.05%. Ebenso ist bei dieser Konstellation ein stattgehabter Kontakt mit *M. tuberculosis* auf immunologischer Ebene bestätigt. In Abbildung 5C und Abbildung 5D sind Beispiele dargestellt, bei denen kein Kontakt zu *M. tuberculosis* bekannt ist. Abbildung 5C zeigt eine Konstellation, die mit einer BCG-Impfantwort bzw. mit einem Kontakt zu nicht tuberkulösen Mycobakterien (NTM) vereinbar wäre. Bei diesem Probanden zeigte sich eine isolierte Reaktivität auf das PPD Antigen, bei dem der Anteil reaktiver CD4 Zellen 0.08% betrug. In diesem Fall lagen die Reaktivitäten in der PBS Kontrolle sowie in den spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 unterhalb der Nachweisgrenze (PBS: 0.00%, ESAT-6:

0.01%, CFP-10: 0.01%), während in der Positivkontrolle SEB eine deutliche Reaktivität messbar war (4.71%). Hier sprach das Alter der Patientin (1990 geboren) für eine BCG-Impfung, da diese bis 1998 in Deutschland empfohlen wurde. Beim Großteil der untersuchten Kontrollgruppe ließen sich jedoch keine spezifischen CD4 Zellen gegen die verwendeten Antigene nachweisen. Abbildung 5D zeigt das Beispiel eines Kindes, bei dem der Anteil reaktiver CD4 T-Zellen sowohl bei PPD als auch bei ESAT-6 oder CFP-10 unterhalb der Nachweisgrenze von 0.05% lag (PBS: 0.00%, PPD: 0.00%, ESAT-6: 0.01%, CFP-10=0.01%). Hier wurde jedoch durch die positive Reaktion auf SEB sichergestellt (2.23%), dass die CD4 T-Zellen generell zur Zytokin Produktion in der Lage waren. An diesen Beispielen wird deutlich, dass ohne Verwendung der spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 keine Unterscheidung zwischen einem Kontakt mit *M. tuberculosis* und einer BCG-Impfung bzw. NTM-Infektion möglich ist. Die Reaktivität auf die Positivkontrolle ist essentiell, um bei fehlender Reaktivität auf PPD oder ESAT-6/CFP-10 eine generelle Immuninkompetenz auszuschließen.

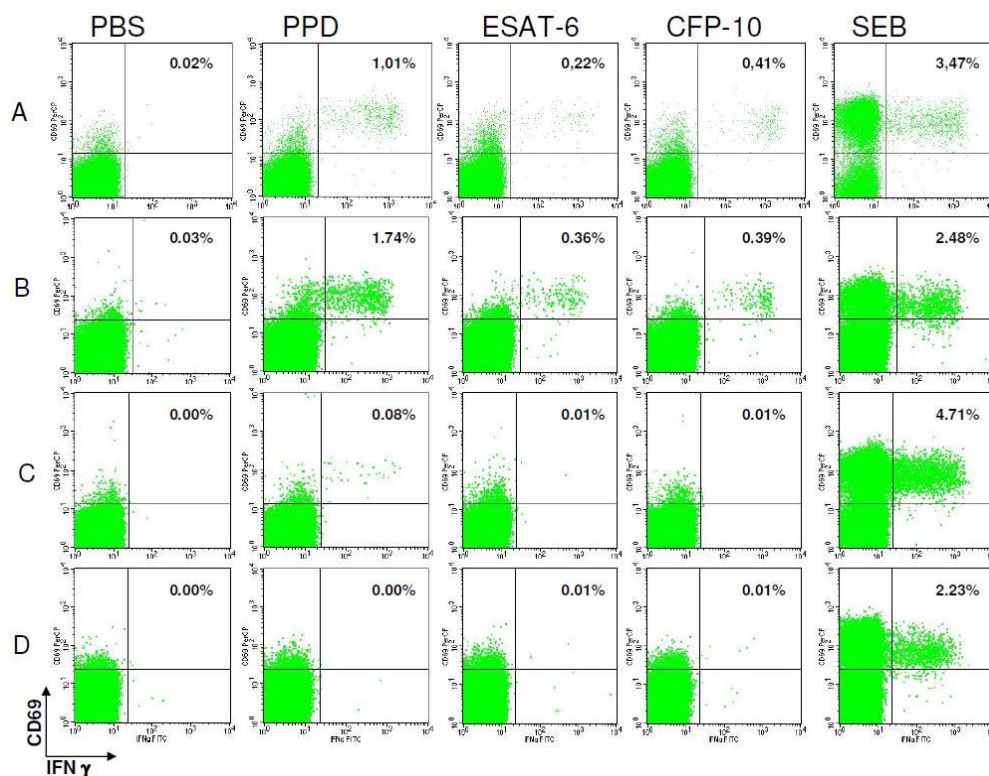


Abbildung 5: Repräsentative FACS-Diagramme mit prozentualen Anteil der PPD, ESAT-6 und CFP-10 spezifischen CD4 T-Zellen, PBS dient als Negativkontrolle, SEB als Positivkontrolle: CD4 positiven Zellen wurden weiter auf CD69 und IFN γ untersucht. Hier ist CD69 gegen IFN γ aufgetragen. Als spezifische Zellen gelten doppelt-positive Zellen im rechten oberen Quadranten, dargestellt mit dem jeweiligen prozentualen Anteil an allen Lymphozyten. **A:** Patient mit aktiver Tuberkulose **B:** Patient mit behandelter aktiver Tuberkulose **C:** Patient mit vermutlicher BCG-Impfung **D:** Patient ohne Kontakt zu *M. tuberculosis*.

4.2 Reaktivitätsvergleich bei Kindern mit Kontakt zu *M. tuberculosis*

Im Folgenden wurden Kinder mit Kontakt zu *M. tuberculosis*, mit Verdacht auf Tuberkulose oder mit erfolgreich behandelter Tuberkulose untersucht. Die klinischen Daten der Patienten sowie die Ergebnisse des durchflusszytometrischen Tests und weiterer diagnostischer Verfahren sind in Tabelle 7 dargestellt.

Untersucht wurden vier Kinder mit einer therapiebedürftigen Tuberkulose (# 1-4), ein Kind welches eine prophylaktische Behandlung erhielt (# 5), sowie drei Kinder mit einer behandelten Tuberkulose in der Vorgeschichte (# 6-8). Von vier dieser Patienten wurde das Blut zur durchflusszytometrischen Analyse sowie die Ergebnissen der klinischen Parameter freundlicherweise von der Fachklinik Wangen zur Verfügung gestellt. Als diagnostisch richtungsweisende Parameter dienten bei den Kindern mit aktiver Tuberkulose sowie dem Kind, welches eine Isoniazidprophylaxe erhielt, eine Röntgen-Thorax-Aufnahme, ein mikroskopischer und kultureller Keimnachweis, der Tuberkulin-Hauttest (THT) sowie der T-SPOT.TB Assay. Bei den Kindern # 1-4 wurde eine Tuberkulose-Therapie eingeleitet. Für die durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Antigene PPD, ESAT-6 und CFP-10 untersucht. Alle Patienten zeigten eine deutliche Reaktivität in der Positivkontrolle (nicht gezeigt).

Bei drei der vier Patienten (# 1-3), welche aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes therapiert wurden, zeigte sich ein positives Testergebnis bei der durchflusszytometrischen Untersuchung. Bei dem vierten Patienten (# 4), der 2,25 Jahre alt war, konnte keine Reaktion in den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen nachgewiesen werden. Dieser Patient zeigte jedoch mit einer Frequenz von 0.20% reaktiver T-Zellen eine deutliche positive Reaktion gegen PPD, welche im Einklang mit einer deutlichen Hauttest-Induration von 10 mm steht.

Des Weiteren wurde ein 1,84 Jahre altes Kind (# 5) getestet, welches im Rahmen einer Umgebungsuntersuchung einer Chemoprophylaxe erhielt. Hier zeigte sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung keine Reaktivität gegen die spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10. Es konnte auch keine Reaktion auf das PPD Antigen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem negativen THT, dem negativem T-SPOT.TB, dem unauffälligen Röntgen-Thorax sowie einem negativem Keimnachweis. Trotz dieser unauffälligen Befundkonstellation wurde das Kind bei einem Alter unter 5 Jahren gemäß Richtlinien einer Isoniazid-Prophylaxe zugeführt. Die drei Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose in der Vorgeschichte zeigten alle ein positives Testergebnis.

Tabelle 7: Falldarstellung einzelner Patienten mit Kontakt zu *M. tuberculosis* mit klinischen Untersuchungsergebnissen und dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung.

#	Alter (Jahre)	THT ¹	T-SPOT.TB	Rö-Thorax ⁴	Keimnachweis		Therapie?	% reaktive T-Zellen ³ gegen			
					Mikroskopisch	Kulturell		PPD	ESAT-6	CFP-10	Ergebnis
1	1.43	positiv 16-18 mm	n.d. ²	-	nein	nein	ja	0.94	0.20	0.15	positiv
2	2.10	n.d.	positiv	+	nein	ja <i>M. tuberculosis</i>	ja	0.25	0.00	0.07	positiv
3	5.89	positiv	n.d.	+	nein	nein	ja	0.99	0.20	0.39	positiv
4	2.25	positiv 10 mm	n.d.	+	nein	nein	ja	0.20	0.00	0.00	negativ
5	1.84	negativ	negativ	-	nein	nein	Isoniazid- Prophylaxe	0.02	0.01	0.00	negativ
6	3.64	Rifampicin-resistente Tuberkulose 3 Jahre zuvor						0.10	0.00	0.05	positiv
7	4.00	Offene Tuberkulose mit Keimnachweis aus Magensekret und Bronchialaspirat 3,6 Jahre zuvor						0.23	0.06	0.03	positiv
8	17.66	Offene Tuberkulose 2,5 Jahre zuvor						1.71	0.33	0.36	positiv

¹THT: Tuberkulin Hauttest; ²n.d. nicht durchgeführt; ³abzüglich der Negativkontrolle; ⁴+ entspricht TB-suspektem Röntgen-Thorax-Befund.

4.3 Quantitative und qualitative Untersuchung der CD4 T-Zellreaktivität bei immungesunden Kindern und Erwachsenen im Altersverlauf

Zu Beginn wurde eine epidemiologische Untersuchung der Immunantwort auf PPD, SEB und die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 in einem Niedrig-Risikogebiet in verschiedenen Altersgruppen vorgenommen. Hierzu wurden 1702 Probanden (139 Kinder und 1563 Erwachsene) ohne bekannten Kontakt zu *M. tuberculosis* untersucht und die Frequenz Antigen reaktiver T-Zellen wurde altersabhängig sowohl quantitativ als auch qualitativ analysiert. Es ist zu beachten, dass die T-Zell Stimulationen bei einigen Probanden aus logistischen Gründen nicht mit allen Antigenen durchgeführt werden konnte.

4.3.1 Altersabhängige Zunahme der PPD spezifischen CD4 T-Zellreaktivität bei Kindern und Erwachsenen ohne bekannten Kontakt zu *M. tuberculosis*

Im Folgenden wurde die Immunantwort auf das PPD Antigen untersucht (Abbildung 6). Hierzu wurde sowohl der prozentuale Anteil PPD reaktiver CD4 T-Zellen, als auch der Anteil einer PPD positiven Reaktion pro Gruppe untersucht. Als positiv wurde eine Reaktion dann gewertet, wenn die Frequenz spezifischer CD4 T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle bei $\geq 0.05\%$ lag. Die Untersuchung zeigte einen signifikanten Anstieg im Anteil der Probanden mit positiver PPD Reaktion im Altersverlauf ($p < 0.0001$). In der Gruppe der 0 bis <5 jährigen wurden 17 Kinder untersucht, von denen keines eine positive PPD Reaktion zeigte (0%). Demgegenüber zeigten in der Gruppe der 5 bis <10 Jahre alten Kindern bereits 14.29% eine positive Reaktion auf PPD, bei den 10 bis <15 Jährigen waren es 26.53%. Interessanterweise war in der Altersgruppe 15 bis <20 bereits bei nahezu 50% der Kinder ein positives Testergebnis zu verzeichnen. Dieser prozentuale Anteil PPD positiver Probanden blieb in den folgenden Altersgruppen im Wesentlichen konstant.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der quantitativen Betrachtung der Mediane der Frequenzen PPD reaktiver CD4 T-Zellen, die eine altersabhängige Zunahme aufwiesen ($p = 0.0001$). Bis zum 15. Lebensjahr lagen die Mediane weit unterhalb der Nachweisgrenze von 0.05% (0 bis <5: 0.0125%, 5 bis <10: 0.0125%, 10 bis <15: 0.025%). Bei den älteren Probanden lagen die Mediane der Frequenzen bei etwa 0.05%. Die höchsten Mediane (0.076%) und prozentualen Anteile von Probanden mit Reaktivität oberhalb der Nachweisgrenze (59.6%) waren hierbei in der Altersgruppe 30 bis <40 Jahre zu finden (Abbildung 6).

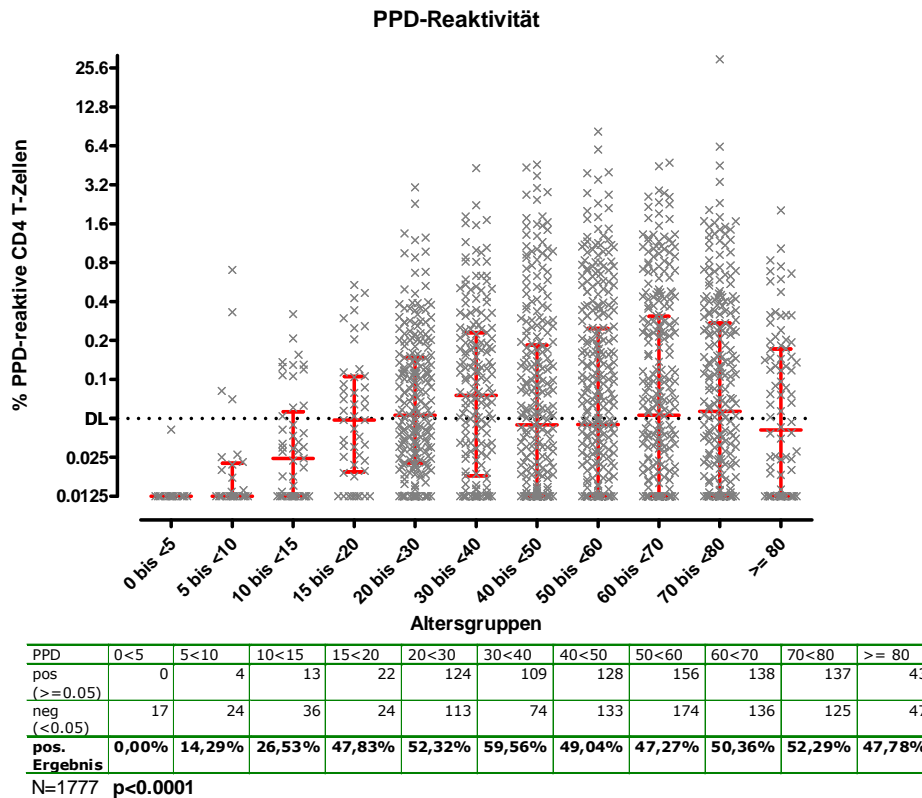


Abbildung 6: Die PPD Reaktivität steigt signifikant mit zunehmendem Alter. PPD Reaktivität aufgeteilt in Altersgruppen. Diagramm: Ein Kreuz entspricht dem prozentualen Anteil der PPD reaktiven CD4 Zellen, wobei im Falle von mehrfach gemessenen Probanden der gemittelte Wert dargestellt ist. Für jede Gruppe ist der Median mit 25 und 75% Percentile (rot) angegeben. Tabelle: Anzahl von Patienten mit einer positiven Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze von 0.05% reaktiver Zellen sowie der prozentualer Anteil einer positiven Reaktion in verschiedenen Altersgruppen.

Um sicherzustellen, dass die geringere PPD Reaktivität bei Kindern nicht auf einer generell eingeschränkten T-Zell Funktion beruht, wurde die Reaktivität der SEB Positivkontrolle in altersabhängiger Weise analysiert. Hierzu wurden 639 Probanden untersucht und in die gleichen Altersgruppen wie bei der PPD Analyse eingeteilt (Abbildung 7). Bei der qualitativen Analyse zeigte sich, dass lediglich 5 der 639 Probanden eine SEB Reaktivität unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen (2 Kinder und 3 Erwachsene) und qualitativ bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0.4255$). Bei der quantitativen Analyse der SEB reaktiven CD4 T-Zellen war deren Frequenz jedoch in der Altersgruppe der 0-5 jährigen am geringsten (Median 0.53%) und zeigte eine signifikante altersabhängige Zunahme, die jedoch ab einem Alter von ca. 10-20 Jahren ein stabiles Niveau erreichte ($p < 0.0001$, Abbildung 7). Wenngleich qualitativ keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten waren, könnte die insgesamt geringere Frequenz SEB reaktiver T-Zellen in der jüngsten Altersgruppe auf eine geringfügig eingeschränkte Nachweisbarkeit Antigen spezifischer T-Zellen in jungen Jahren hinweisen. In Abschnitt 4.8 wird untersucht, inwieweit die Sensitivität durch zusätzliche Analyse weiterer Zytokine erhöht werden kann.

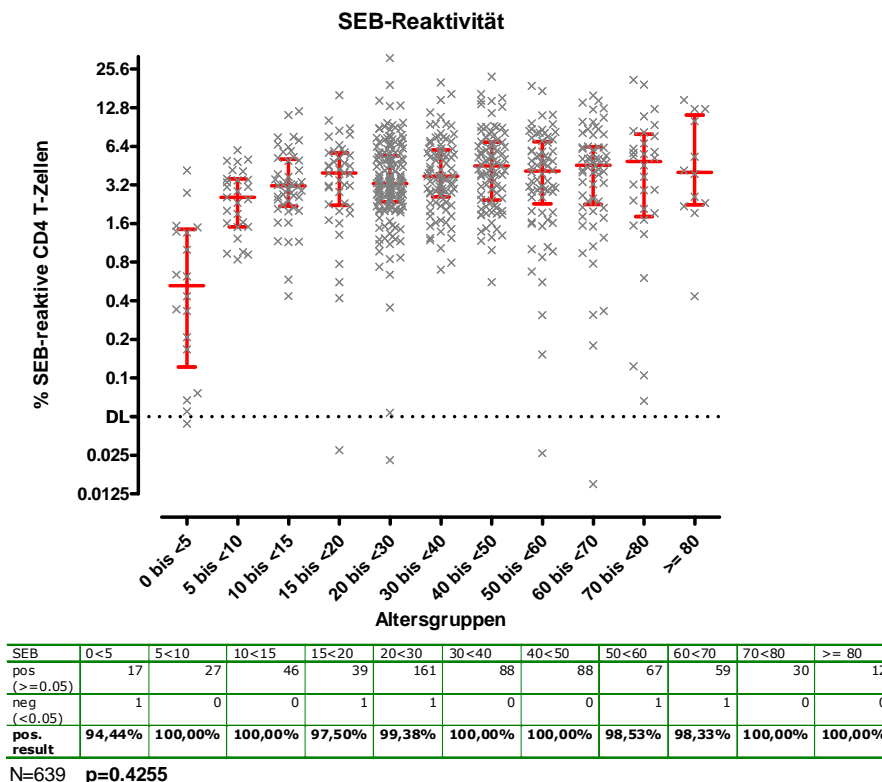


Abbildung 7: Eine deutliche SEB Reaktion ist in allen Altersgruppen nachweisbar. SEB Reaktivität aufgeteilt in Altersgruppen. Diagramm: Ein Kreuz entspricht dem prozentualen Anteil der SEB reaktiven CD4 Zellen, wobei im Falle von mehrfach gemessenen Probanden der gemittelte Wert dargestellt ist. Für jede Gruppe ist der Median mit 25 und 75% Percentile (rot) angegeben. Tabelle: Anzahl von Patienten mit einer positiven Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze von 0.05% reaktiver Zellen sowie der prozentualer Anteil einer positiven Reaktion in verschiedenen Altersgruppen.

4.3.3 Altersabhängige Zunahme in der CD4 T-Zellreaktivität gegen ESAT-6 und CFP-10

Im Folgenden wurde die Reaktivität auf die spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 in den verschiedenen Altersgruppen verglichen. Eine ESAT-6 Stimulation wurde bei 1605 Patienten durchgeführt, eine CFP-10 Stimulation erfolgte bei 1223 Patienten. In Abbildung 8 sind sowohl die Frequenz der spezifischen CD4 Zellen als auch die Prävalenz einer positiven Reaktion in Abhängigkeit des Alters dargestellt. Da die Mediane der Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen bei allen Altersgruppen unter 0.0125% lagen, sind hier die 75%-Percentile dargestellt. Auch hier zeigte sich eine signifikante Zunahme in der Frequenz reaktiver T-Zellen mit zunehmendem Alter (CFP-10: $p < 0.0001$; ESAT-6: $p = 0.046$). Beim Vergleich der beiden Antigene fiel auf, dass die T-Zellreaktivität bei Kindern hauptsächlich gegen ESAT-6 gerichtet war. Dies wurde insbesondere bei der qualitativen Betrachtung der Prävalenz einer positiven Reaktion deutlich, denn es zeigten 9.8% aller Kinder eine Reaktivität gegen ESAT-6, während lediglich 0.8% aller Kinder eine Reaktivität gegen CFP-10 aufwiesen. Demgegenüber war der prozentuale Anteil bei Erwachsenen ähnlich hoch (16.1% gegen ESAT-6 und 13.5% gegen CFP-10). Dies bedingt, dass die Prävalenz einer

positiven Reaktion gegen das ESAT-6 Antigen keine signifikanten Unterschiede in den Altersgruppen zeigte ($p=0.202$), während bei CFP-10 eine altersabhängige Zunahme zu verzeichnen war ($p<0.0001$).

Im klinischen Alltag werden die Reaktivitäten der beiden spezifischen Antigene zusammengefasst beurteilt. Wie auch bei den kommerziellen IGRA gilt ein Testergebnis als positiv, wenn eines der beiden spezifischen Antigene positiv reagiert. Für diese Untersuchung wurden lediglich Probanden herangezogen, bei denen ein Ergebnis in beiden Antigenen vorlag ($N=1221$). In diesem Fall fand sich bei 10.7% aller Kinder und bei 21.5% aller Erwachsenen eine positive Reaktion.

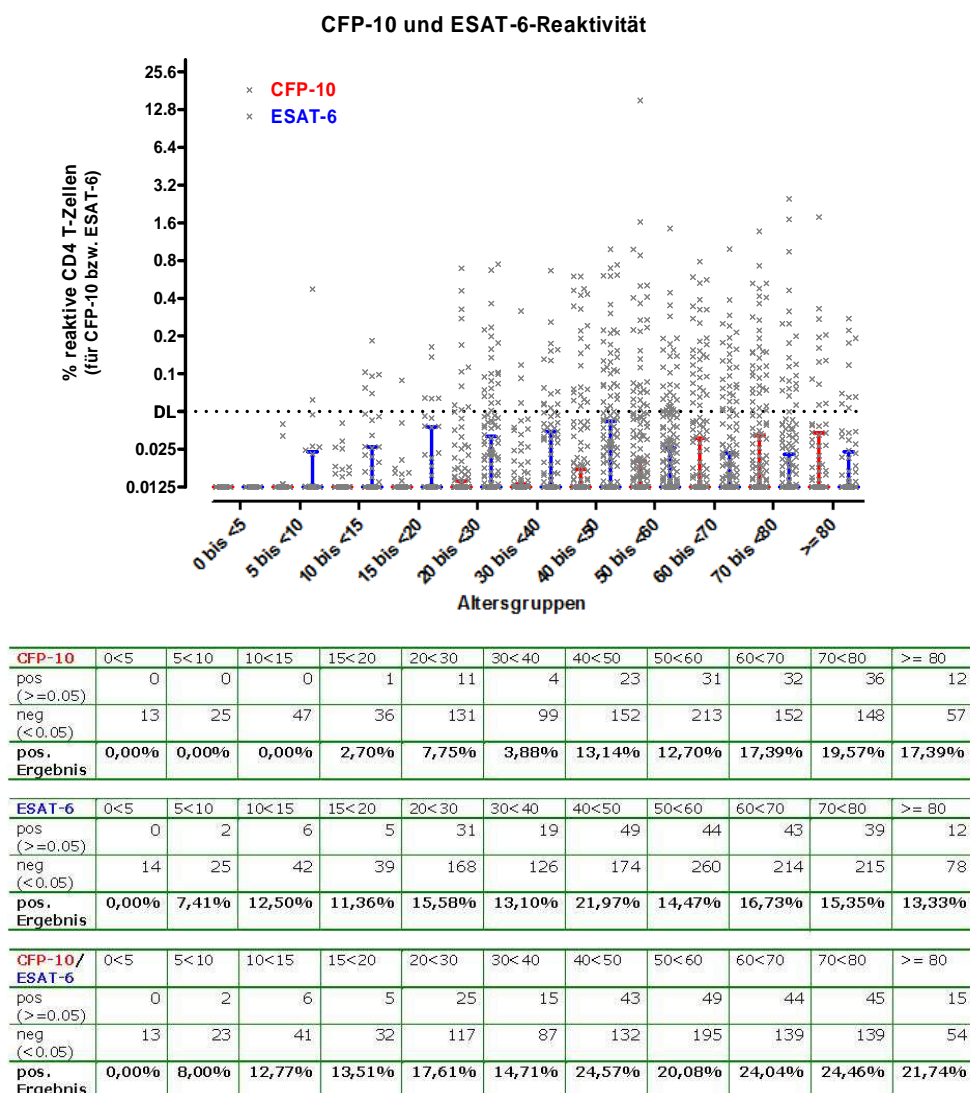


Abbildung 8: Die ESAT-6 und CFP-10 Reaktivität zeigen einen steigenden Trend mit zunehmendem Alter. ESAT-6 und CFP-10 Reaktivität aufgeteilt in Altersgruppen. Diagramm: Ein Kreuz entspricht dem prozentualen Anteil reaktiven CD4 Zellen, wobei im Falle von mehrfach gemessenen Probanden der gemittelte Wert dargestellt ist. Für jede Gruppe ist die 75% Percentile (blau für ESAT-6, rot für CFP-10) angegeben. Tabellen: Anzahl von Patienten mit einer positiven Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze von 0.05% reaktiver Zellen sowie der prozentualer Anteil einer positiven Reaktion in verschiedenen Altersgruppen. Von Oben nach unten: Positive Reaktion auf CFP-10, positive Reaktion auf ESAT-6, positive Reaktion auf mindestens eines der spezifischen Antigene.

4.4 CD4 T-Zellreaktivität bei gesunden im Vergleich zu chronisch kranken Kindern ohne bekannten Kontakt zu *M. tuberculosis*

Nach der Durchführung des durchflusszytometrischen Verfahrens bei gesunden Kindern und Erwachsenen wurden im Folgenden Kinder mit chronischen Erkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und cystische Fibrose (CF) analysiert. Es wurden 25 Kinder mit CED (M. Crohn und Colitis ulcerosa) und 50 Kinder mit CF untersucht, wobei bei einem CF-Erkrankten leider keine SEB Stimulation erfolgte. Auch hier wurden die Reaktivitäten gegen die Antigene PPD, SEB, ESAT-6 und CFP-10 analysiert und mit den 139 gesunden Kindern aus Abschnitt 4.3 verglichen, die als Kontrollgruppe dienten. Die SEB Stimulation erfolgte bei 130 Kindern, die Stimulation gegen ESAT-6 bei 132 Kindern und die gegen CFP-10 bei 121 Kindern aus der Kontrollgruppe.

Abbildung 9 zeigt den Vergleich der PPD Reaktivität zwischen gesunden Kindern sowie Kindern mit CED oder CF. Wie auch schon in Abschnitt 4.3 erfolgte sowohl eine quantitative Analyse der Frequenz reaktiver CD4 Zellen als auch eine qualitative Analyse der Prävalenz einer positiven Reaktion. Trotz erhöhten Infektionsrisikos zeigten Kinder mit CED oder CF weder im quantitativen ($p=0.432$) noch im qualitativen Vergleich ($p=0.256$) signifikante Unterschiede zu gesunden Kindern.

Um Unterschiede in der generellen T-Zellreaktivität auszuschließen, wurde die T-Zell Reaktion nach Stimulation mit der Positivkontrolle SEB untersucht (Abbildung 9). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz einer positiven Reaktion ($p=0.563$), denn alle 74 Kinder mit CED und CF zeigten eine nachweisbare Reaktion, während diese bei zwei von 130 Kindern der Kontrollgruppe unterhalb der Nachweisgrenze lag. Darüber hinaus waren keine Unterschiede im Median der Frequenzen reaktiver CD4 T-Zellen zu detektieren. Folglich ergaben sich keine Hinweise für eine eingeschränkte Immunreaktion bei Kindern mit CED oder CF.

Auch beim Vergleich der Reaktivität gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 fanden sich weder in quantitativer noch in qualitativer Hinsicht Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 10). Dies galt sowohl für die isolierte Betrachtung der jeweiligen Antigene als auch für die Kombination der Reaktivitäten von ESAT-6 und CFP-10. So unterschied sich weder die Frequenz reaktiver Zellen (ESAT-6: $p=0.410$; CFP-10: $p=0.722$) noch die Prävalenz einer positiven Reaktion (ESAT-6: $p=0.173$; CFP-10: $p=0.252$). Ähnlich wie bei gesunden Kindern waren jedoch auch bei Kindern mit CED oder CF eine Dominanz in der Reaktivität gegen ESAT-6 zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass sich bei keinem der verwendeten Antigene signifikante Unterschiede zwischen gesunden Kindern und Kindern mit CED oder CF aufzeigen lassen. Dies gilt sowohl für die Frequenz reaktiver CD4 Zellen als auch für die Prävalenz einer positiven Reaktion.

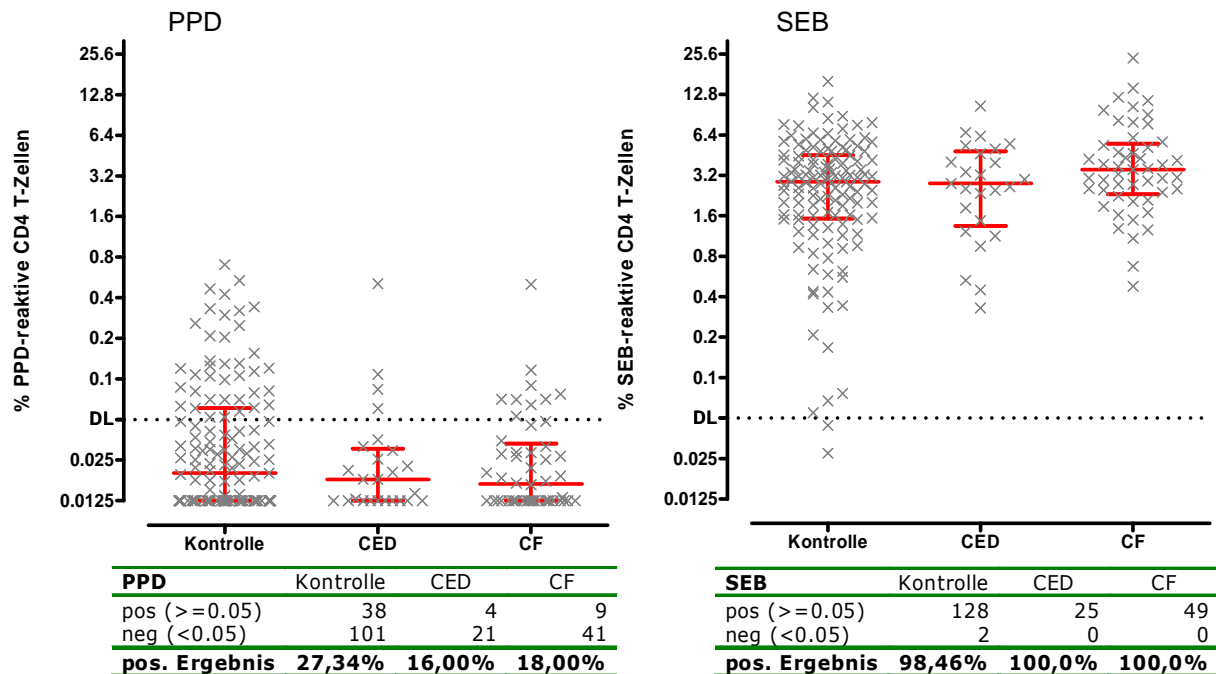


Abbildung 9: Die PPD Reaktivität unterscheidet sich nicht zwischen gesunden und chronisch erkrankten Kindern. Eine Immunantwort in der Positivkontrolle ist in allen Gruppen nachweisbar: Reaktivität aufgeteilt nach Grunderkrankung: Diagramm: Ein Kreuz entspricht dem prozentualen Anteil der reaktiven CD4 Zellen, wobei im Falle von mehrfach gemessenen Probanden der gemittelte Wert dargestellt ist. Für jede Gruppe ist der Median mit 25 und 75% Percentile (rot) angegeben. Tabelle: Anzahl von Patienten mit einer positiven Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze von 0.05% reaktiver Zellen sowie der prozentualer Anteil einer positiven Reaktion in den verschiedenen Erkrankungsgruppen (CED – chronisch entzündliche Darmerkrankungen; CF – cystische Fibrose).

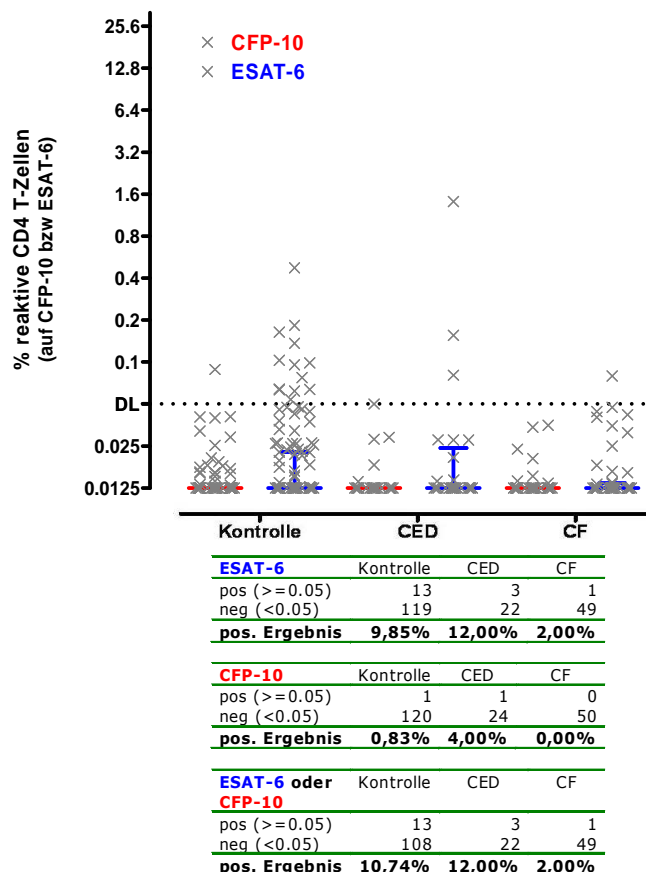


Abbildung 10: Die ESAT-6/CFP-10 Reaktivität unterscheiden sich nicht zwischen gesunden und chronisch erkrankten Kindern. ESAT-6 und CFP-10 Reaktivität aufgeteilt nach Grunderkrankung. Diagramm: Ein Kreuz entspricht dem prozentualen Anteil reaktiver CD4 Zellen, wobei im Falle von mehrfach gemessenen Probanden der gemittelte Wert dargestellt ist. Für jede Gruppe ist die 75% Percentile (blau für ESAT-6, rot für CFP-10) angegeben. Tabellen: Anzahl von Patienten mit einer positiven Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze von 0.05% reaktiver Zellen sowie der prozentuale Anteil einer positiven Reaktion in verschiedenen Altersgruppen. Von Oben nach unten: Positive Reaktion auf CFP-10, positive Reaktion auf ESAT-6, positive Reaktion auf mindestens eines der spezifischen Antigene.

4.5 Vergleich von Kindern und Erwachsenen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder cystischer Fibrose

Neben den unter 4.4 bereits dargestellten Vergleichsuntersuchungen zwischen gesunden Kindern und Kindern mit chronischen Erkrankungen, wurden im Folgenden die Ergebnisse der Kinder mit CED und CF mit denen Erwachsener verglichen. Hierzu wurden zusätzlich 54 Erwachsene mit CED und 11 Erwachsene mit CF untersucht.

Wie zuvor wurden sowohl die Frequenzen reaktiver T-Zellen als auch der prozentuale Anteil einer positiven Reaktion nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen verglichen. In

Abbildung 11 sind Kinder und Jugendliche bis 20 Jahre im Vergleich zu Erwachsenen dargestellt. Es wurden die Antigene PPD, ESAT-6, CFP-10 sowie die Positivkontrolle SEB untersucht. Bei allen Untersuchten konnte eine starke Reaktion auf die Positivkontrolle oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden.

Beim qualitativen Vergleich der PPD Reaktivität fiel der hohe Prozentsatz von 72.7% bei den erwachsenen CF-Patienten auf, während bei den erwachsenen CED-Patienten nur 25.9% eine positive Reaktion aufwiesen. Bei der Betrachtung der ESAT-6 und CFP-10 Reaktivität zeigte jedoch lediglich einer der 11 CF-Patienten eine positive Reaktion, während bei ca. 10 % aller Kinder und Erwachsener mit CED eine positive Reaktion nachweisbar war.

Dies legt nahe, dass die PPD Reaktivität bei 72% der erwachsenen CF-Patienten auf einen Kontakt mit NTM oder auf eine BCG-Impfung zurückzuführen ist.

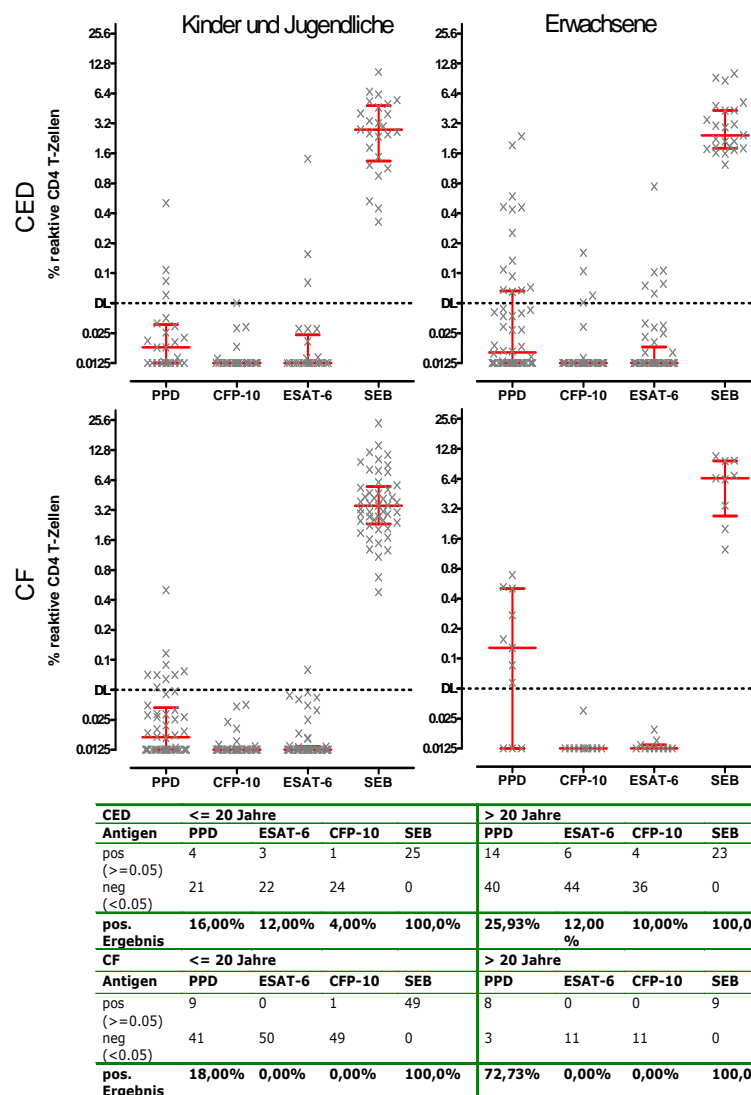


Abbildung 11: Reaktivitätsvergleich von Kinder und Erwachsenen mit chronischen Erkrankungen. Diagramm: Ein Kreuz entspricht dem prozentualen Anteil reaktiver CD4 Zellen, wobei im Falle von mehrfach gemessenen Probanden der gemittelte Wert dargestellt ist. Für jedes Antigen ist der Median mit 25 und 75% Perzentile (rot) angegeben. Tabelle: Anzahl von Patienten mit einer positiven Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze von 0.05% reaktiver Zellen sowie der prozentualer Anteil einer positiven Reaktion auf die verschiedenen Antigene.

4.6 Vergleichende Untersuchung der ESAT-6 und PPD Reaktivität

In bisherigen Untersuchungen bei Erwachsenen war eine spezifische Immunantwort gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 in aller Regel mit einer positiven Reaktion gegen PPD assoziiert. Die bei den vorherigen Untersuchungen auffällig gewordene Dominanz einer Reaktivität gegen das ESAT-6 Antigen bei Kindern wurde im Folgenden näher untersucht und mit der Reaktivität gegen PPD in Relation gesetzt. Für diese Analyse wurden alle Proben von Gesunden mit einer ESAT-6 Antwort oberhalb der Nachweisgrenze herangezogen. Hierzu wurde der Quotient zwischen der Frequenz PPD reaktiver und ESAT-6 reaktiver CD4 T-Zellen gebildet (Abbildung 12). Bei Kindern betrug dieser Quotient 0.68, was bedeutet, dass die Frequenz ESAT-6 reaktiver CD4 T-Zellen bei Kindern im Median über der Frequenz der PPD reaktiver T-Zellen lag. Bei Erwachsenen war der Quotient stets größer als 1 und stieg im Altersverlauf signifikant an (20 bis <40: 1.92, 40 bis <60: 3.14, ≥ 60 : 3.55, $p < 0.0001$).

Analysiert man den Anteil der Probanden, bei denen die Frequenz PPD reaktiver CD4 T-Zellen über der ESAT-6 reaktiver Zellen lag, so ist auch hier eine signifikante Zunahme zu verzeichnen ($p < 0.0001$). Bei den Kindern überwog die Frequenz PPD reaktiver T-Zellen bei lediglich 30.8%, während dies bei nahezu allen Probanden der Altersgruppe über 60 Jahren der Fall war (92.6%, Abbildung 12).

Als mögliche Erklärung hierfür bietet sich zum einen eine Kreuzreaktivität des ESAT-6 Antigens mit Antigenen anderer Mycobakterien oder anderen, bisher unbekannten Antigenen an. Als weitere Erklärung käme eine relative Immundominanz von ESAT-6 bei der Erst-Induktion einer spezifischen Immunantwort in Frage.

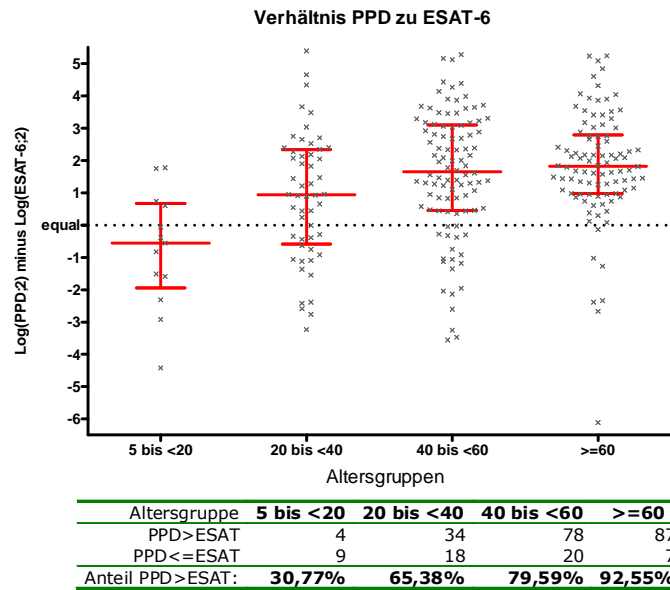


Abbildung 12: Dominanz der ESAT-6 Reaktivität bei Kindern. Dargestellt ist der Quotient zwischen der Frequenz PPD reaktiver CD4 T-Zellen und der Frequenz ESAT-6 reaktiver T-Zellen bei allen Probanden mit nachweisbarer Immunität gegen ESAT-6. Die Patienten wurden in verschiedene Altersgruppen eingeteilt. Für jede Gruppe ist der Median mit 25 und 75% Perzentilen (rot) angegeben. Tabelle: prozentualer Anteil der Untersuchten mit einer höheren Frequenz reaktiver T-Zellen auf PPD als auf ESAT-6 in den verschiedenen Altersgruppen.

4.7 Serologische Testverfahren

Als Ergänzung zu den zellulären Analysen als weiterer Bestandteil der Tuberkulosedagnostik wurde bei 172 Kindern ein ELISA-basierter Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG, IgM und IgA durchgeführt. In Abbildung 13 sind je zwei Antikörperklassen im Vergleich dargestellt. Die Antikörpermenge wurde anhand von Standardkurven kalkuliert und der jeweilige Zahlenwert gegeneinander aufgetragen. Eine leichte Korrelation mit einem Spearman $r = 0,288$ bestand zwischen den Antikörpern der Klasse IgG und IgA, während ansonsten keinerlei Korrelationen sichtbar waren.

Insgesamt fanden sich bei keinem der 172 Kinder IgG-, IgM- und IgA-Antikörpertiter oberhalb der Nachweisgrenze von 3. Auch eine Korrelation mit der Frequenz PPD, ESAT-6 oder CFP-10 reaktiver T-Zellen war nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Darüber lag bei keinem der in Tabelle 7 genannten Risiko-Patienten ein positives Ergebnis vor. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass *M. tuberculosis* spezifischen Antikörpern keine Rolle bei der Diagnose einer aktiven oder latenten Infektion zu kommen.

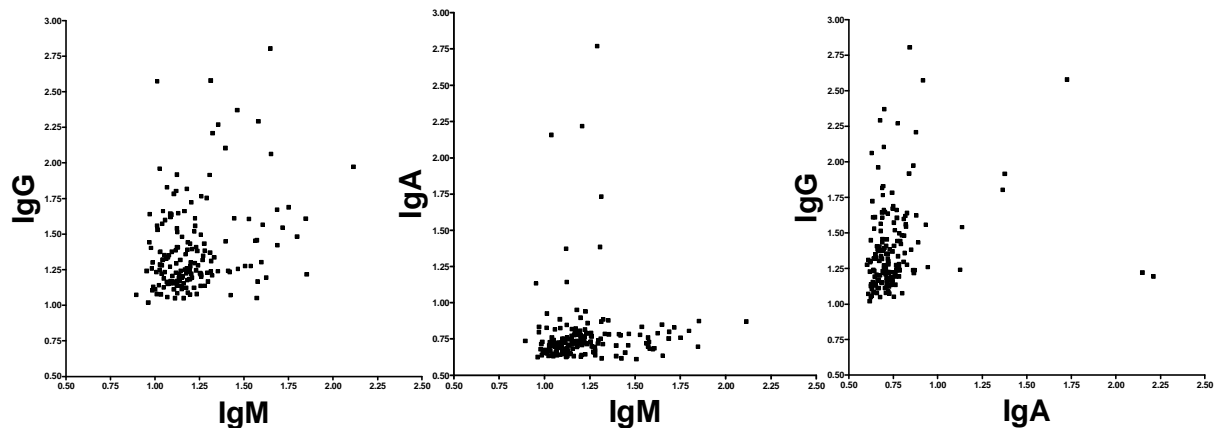


Abbildung 13: Es lässt sich keine sinnvolle Korrelation der Antikörper erkennen. ELISA-basierter Antikörperrnachweis: Ein Punkt entspricht dem Vergleich von zwei Antikörperklassen. Von links nach rechts: IgG vs. IgM; IgA vs. IgM; IgG vs. IgA. Die Antikörper sind in den im Test vorgegebenen Titerstufen dargestellt, die Werte zwischen 0-5 annehmen können. Die Nachweisgrenze einer positiven Reaktion liegt bei 3.

4.8 Analyse des IFN γ /IL-2 Zytokinprofils Antigen spezifischer CD4 T-Zellen

Bisherige Untersuchungen mit kommerziellen IFN γ release assays zeigen einen höheren Anteil an „unschlüssigen“ Ergebnissen, bedingt durch eine unzureichende Sekretion von IFN γ in der Positivkontrolle (STEFAN et al., 2010; MENDEZ-ECHEVARRIA et al., 2011). Eine geringere Frequenz IFN γ produzierender CD4 T-Zellen ist auch, wie die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, bei Kindern unter 5 Jahren gefunden worden (s. 4.3.2). Um zu überprüfen, ob andere Zytokine besser als Readout für eine Immunreaktion geeignet sind, wurde zusätzlich zur Analyse der Expression von IFN γ eine durchflusszytometrische Untersuchung der IL-2 Produktion nach Stimulation mit der Positivkontrolle SEB sowie dem PPD Antigen vorgenommen. Dies erfolgte bei 118 Kindern für SEB und 140 Kindern für das PPD Antigen. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Korrelation zwischen der IL-2 und der IFN γ Produktion, sowohl für die SEB Stimulation ($r=0.6142$, $p<0.0001$) als auch für die PPD Stimulation ($r=0.8635$, $p<0.0001$). Im Weiteren wurden der prozentuale Anteil IL-2 produzierender CD4 T-Zellen im Vergleich zum Anteil IFN γ produzierenden Zellen in verschiedenen Altersgruppen der SEB Stimulation untersucht (Abbildung 14). Dabei wurde sichtbar, dass der prozentuale Anteil IL-2 produzierender CD4 T-Zellen generell über dem der IFN γ positiven Zellen lag und dass die Produktion beider Zytokine mit zunehmendem Alter auf ein konstantes Niveau anstieg. Der Unterschied zwischen beiden Zytokinen verkleinerte sich jedoch mit zunehmendem Alter. So lag der Quotient zwischen dem prozentualen Anteil IL-2 positiver und dem Anteil IFN γ positiver Zellen bei Kindern unter 5 Jahren bei 3.22 und ist signifikant höher als der der anderen Altersgruppen ($p<0.0001$; 2.59, 2.16 und 1.89).

Es stellt sich nun die Frage, ob durch die Untersuchung von IL-2 auch im PPD Antigen mehr Kinder positiv getestet werden können. Hierzu wurde in Abbildung 15 die Anzahl IFN γ und

IL-2 produzierenden T-Zellen gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass es hierbei keine sichtbar signifikanten Unterschiede gab. Kein Proband konnte durch Analyse von IL-2 zusätzlich positiv getestet werden.

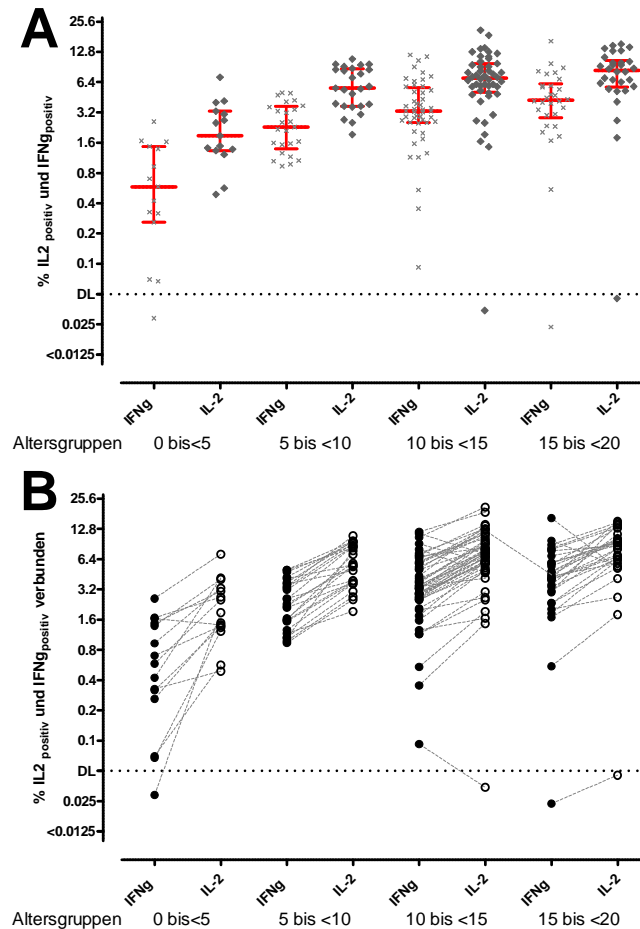


Abbildung 14: IL-2 ist stärker nachweisbar als IFN γ . **A:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil SEB reaktiver CD4 T-Zellen mit Fähigkeit zur Produktion von IL-2 (Raute) bzw. IFN γ (Kreuz), in verschiedenen Altersgruppen. Dargestellt sind die Median mit 25%/75% Perzentile. **B:** Die IFN γ und IL-2 Antwort jeweils eines Patienten ist mittels Linie verbunden.

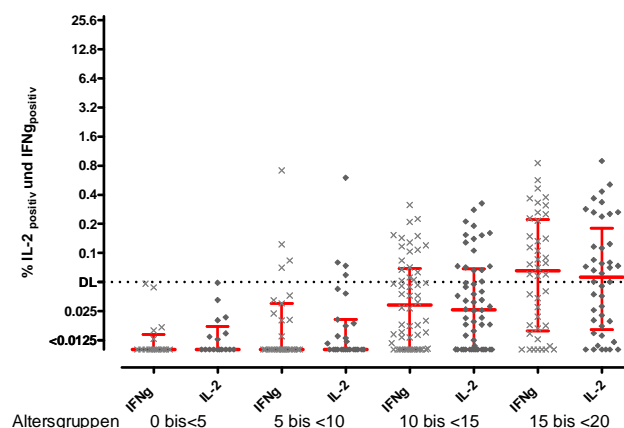


Abbildung 15: Beim Nachweis einer Reaktivität gegen *M. tuberculosis* bietet IL-2 keine diagnostischen Vorteile. Dargestellt ist der prozentuale Anteil PPD reaktiver CD4 T-Zellen mit Fähigkeit zur Produktion von IL-2 bzw. IFN γ in verschiedenen Altersgruppen. Dargestellt sind die Median mit 25%/75% Perzentile.

4.9 Beispiele klinisch interessanter Fälle

Bei einigen Kindern erfolgte eine ausführliche Tuberkulose-Diagnostik, bei der neben der durchflusszytometrischen Analyse zusätzlich der ELISA-basierte QuantiFERON TB Gold in Tube Assay, der ELISPOT-basierte T-SPOT.TB Assay sowie serologische Untersuchungsverfahren durchgeführt wurden. Diese machte eine exemplarische Überprüfung der Übereinstimmung der Durchflusszytometrie mit anderen Testverfahren möglich. Diese vergleichenden Untersuchungen waren nicht systematisch möglich, da nur ein begrenztes Blutvolumen zur Verfügung stand. Exemplarisch sind nun im Folgenden nun zwei Fälle vorgestellt.

Bei einer 5.93 jährigen Patientin mit bekannter cystischer Fibrose konnte das negative Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung auch in allen anderen Testverfahren bestätigt werden. In der Durchflusszytometrie waren abzüglich der Negativkontrolle jeweils 0.01% reaktive CD4 T-Zellen gegen PPD, ESAT-6 und CFP-10 nachweisbar. Die Positivkontrolle SEB lag mit 5.61% reaktiven Zellen deutlich oberhalb der Nachweisgrenze. Im T-SPOT.TB Assay waren im Panel A (ESAT-6) und Panel B (CFP-10) je 3 Spots sichtbar, in der Negativkontrolle war ein Spot und in der PHA-Positivkontrolle 20 Spots detektierbar. Der QuantiFERON-TB Gold in Tube Assay ergab für das TB-Röhrchen eine IFN γ Konzentration von 0.26 IE/ml. In der Negativkontrolle lag der Wert bei 0.27 IE/ml und in der PHA-Positivkontrolle bei 5.13 IE/ml. In ähnlicher Weise wie die zellulären Verfahren zeigten auch alle serologischen Verfahren, sowohl der ELISA-basierte als auch der chromatographische Schnelltest, ein negatives Ergebnis.

Bei einer 2.65 jährigen Patientin mit einer NTM-Infektion erfolgte ebenfalls eine detailliertere Untersuchung. Das klinische Bild der Patientin präsentierte sich als eine submandibulären Lymphknotenschwellung. Die Biopsie zeigte säurefeste Stäbchen und der kulturelle Nachweis ergab *M. malmuensae*. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte mit 0.17 % reaktiven CD4 T-Zellen eine deutlich positive Reaktion auf Stimulation mit PPD, während die spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 keine Reaktion auslösten (Abbildung 16A). Somit kam differentialdiagnostisch eine BCG-Impfung oder eine NTM-Infektion in Betracht. Zusätzlich zur Durchflusszytometrie wurde auch der T-SPOT.TB und der QuantiFERON-TB Gold in Tube Assay nach Herstellerangaben sowie zu Vergleichszwecken auch mit dem in der Durchflusszytometrie verwendeten PPD Antigen durchgeführt. Der T-SPOT.TB Test zeigte keine Reaktion auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene, da in keinem der verwendeten Antigene Spots sichtbar waren. Bei der Verwendung des PPD Antigens zeigte

sich eine Reaktion mit 45 Spots (Abbildung 16B). Ebenso ergab der QuantiFERON-TB Gold in Tube mit den im Kit befindlichen *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen ein negatives Ergebnis, während auch hier bei Stimulation mit dem PPD Antigen eine deutlich positive Reaktion nachweisbar war (Abbildung 16C). Des Weiteren wurden serologische Testverfahren durchgeführt. Der ELISA-basierte Antikörperrnachweis zeigte ein für alle Antikörperklassen negatives Ergebnis (Abbildung 16D). Bei der Schnelltestuntersuchung zeigte der TB-ST Tuberculosis Rapid Test, der alle Antikörperklassen erfassen soll, ein negatives Ergebnis, während im TB-GAM Rapid Tuberculosis Test alle drei Antikörperklassen (IgG, IgA, IgM) nachweisbar waren (Abbildung 16E). Es wird deutlich, dass die T-Zellverfahren bei Verwendung der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene zum Ausschluss eines Kontakts zu *M. tuberculosis* nützlich sind. Allerdings bietet die zusätzliche Stimulation mit dem PPD Antigen den Vorteil, auch differenzialdiagnostische Hinweise auf eine NTM-Infektion liefern zu können. Dies zeigte sich sowohl mittels Durchflusszytometrie, mittels ELISPOT Assay und mittels ELISA. Die Ergebnisse der Antikörper-basierten Verfahren waren in ihrem Ergebnis heterogen.

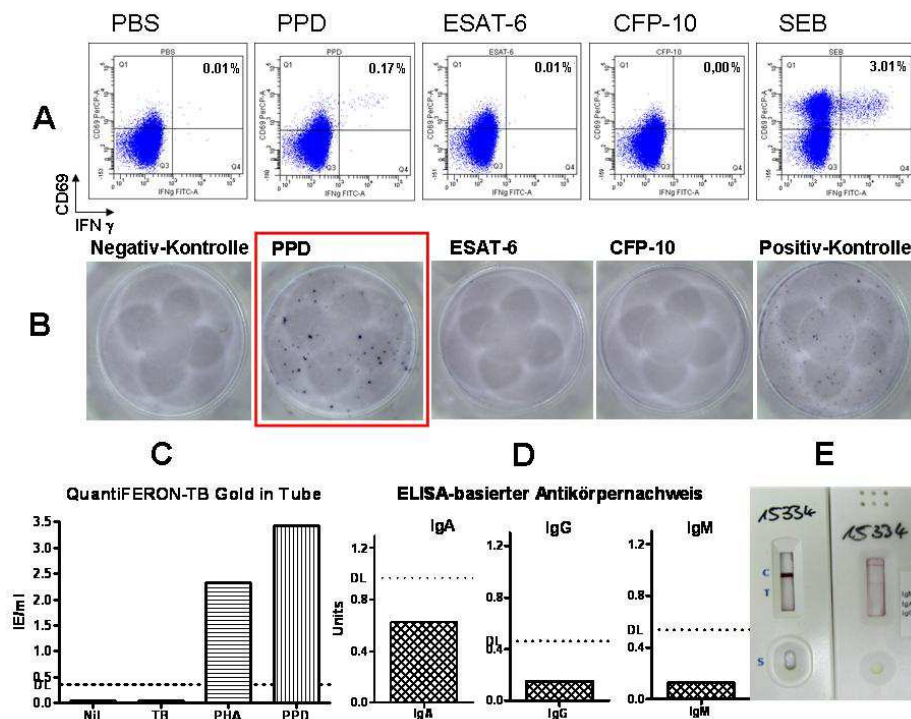


Abbildung 16: Die Untersuchung eines Patienten mit NTM-Infektion mittels verschiedener Nachweisverfahren. A: Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse. PPD mit 0.17 % reaktiver CD4 T-Zellen deutlich oberhalb der Nachweisgrenze. Keine Reaktivität in den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen. **B:** Darstellung des T-SPOT.TB-Assays mit zusätzlicher Untersuchung des PPD Antigens (rot umrandet). Auch hier ist keine Reaktion in den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen messbar. **C:** Darstellung des QuantiFERON-TB Gold in Tube mit deutlich positiver Reaktion auf das PPD Antigen. Der Stimulus TB entspricht dem im Kit befindlichen Antigengemisch, welches aus ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 besteht. **D:** Darstellung des ELISA-basierten Antikörperrnachweis. Alle Antikörperklassen liegen deutlich unterhalb der Nachweisgrenze. **E:** Photographie der durchgeführten serologischen Schnelltests. Links: TB-ST Tuberculosis Rapid Test zeigt keine Reaktion, rechts: TB-GAM Rapid Tuberculosis Test ergibt einen positiven Nachweis von IgM, IgA und IgG.

5 Diskussion

Die Vorteile der TIGRA im Vergleich zum THT zur Diagnostik einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* bei Erwachsenen wurden bereits durch eine Vielzahl von Studien belegt (PAI et al., 2008; SCHLUGER, BURZYNSKI, 2010; DIEL et al., 2011a). Bislang wurden vergleichende Untersuchungen der TIGRA mit dem THT vorwiegend bei immungesunden Erwachsenen und Erwachsenen verschiedener Tuberkulose-Risikogruppen durchgeführt und beschränkten sich hauptsächlich auf die Analyse der beiden kommerziellen Verfahren, dem QuantiFERON Assay und dem ELISPOT Assay. Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung eines neuen durchflusszytometrischen Verfahrens zum Nachweis einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* bei immungesunden Kindern sowie bei chronisch kranken Kindern mit krankheitsbedingt erhöhtem Risiko von Infektionen bzw. mit eingeschränkter Immunfunktion. Hierzu wurde ein umfangreicher Vergleich der T-Zellreaktivität von Kindern im Altersverlauf mit dem Erwachsener vorgenommen. Wenngleich in der vorliegenden Studie kein THT durchgeführt wurde, wurde parallel zu den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 zusätzlich eine Stimulation mit dem im THT angewandten PPD durchgeführt, welche bei Erwachsenen eine deutliche Korrelation mit der THT-Induration zeigt (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006). Vorteile der zusätzlichen Anwendung von PPD liegen darüber hinaus in der Möglichkeit, Patienten mit NTM-Infektionen zu identifizieren, die in einem kommerziellen TIGRA nicht erfasst werden.

Es zeigte sich, dass das durchflusszytometrische Verfahren grundsätzlich auch bei Kindern anwendbar ist. Bei Betrachtung der generellen Reaktivität der zellulären Immunantwort auf den polyklonalen Stimulus SEB zeigten Kinder aller Altersgruppen ähnlich wie Erwachsene eine Reaktivität. Wenngleich die absoluten Frequenzen SEB reaktiver CD4 T-Zellen bei Kindern unter 5 Jahren geringer waren als bei Kindern und Erwachsenen höheren Alters, so lagen die Werte in nahezu 100% der Fälle oberhalb der Nachweisgrenze, was grundsätzlich eine hohe Sensitivität des Verfahrens dokumentiert. Bei der Analyse der T-Zellantwort mit Spezifität gegen mycobakterielle Antigen zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg der PPD Reaktivität mit zunehmendem Alter. Dies galt auch für T-Zellen mit Spezifität gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10. Interessanterweise zeigten Kinder mit cystischer Fibrose oder immunsupprimierte Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen keine Unterschiede im Vergleich zu immungesunden Kindern, was darauf hinweist, dass dieser Test auch bei chronisch kranken Kindern anwendbar ist.

Einige Studien zum Vergleich der kommerziellen TIGRA mit dem THT belegen, dass *in vitro* Verfahren auch in der Anwendung bei Kindern dem THT deutlich überlegen sind (LIGHTER, RIGAUD, 2009; LEWINSOHN et al., 2010; CRUZ et al., 2011). Wie auch bei Erwachsenen lässt sich bei Kindern durch die Kombination von THT und TIGRA eine latente Tuberkuloseinfektion von einer positiven Immunantwort durch BCG-Impfung unterscheiden (FARHAT et al., 2006). Dennoch gibt es auch einige Studien, welche eine Überlegenheit der TIGRA bei Kindern, insbesondere bei unter 5-Jährigen (s. Abschnitt 5.1), in Frage stellen. Diese Arbeiten wurden jedoch vorwiegend in Hoch-Prävalenzregionen durchgeführt, die sich in ähnlicher Weise wie entsprechende Untersuchungen bei Erwachsenen (HILL et al., 2006b) nicht ohne Weiteres mit den Ergebnissen aus Niedrig-Prävalenz-Gebieten vergleichen lassen. So zeigt der T-SPOT.TB Assay bei *M. tuberculosis* exponierten Kindern aus Gambia eine geringere Sensitivität im Vergleich zum THT (HILL et al., 2006a). Eine weitere Arbeit aus Gambia zeigt zwar einen Sensitivitätsgewinn von 10% für die kombinierte Anwendung von TIGRA und THT, allerdings in Verbindung mit einem deutlichen Spezifitätsverlust (ADETIFA et al., 2010).

5.1 Die umstrittene Anwendung von TIGRA bei Kindern unter fünf Jahren

In einigen Studien zur Anwendung von TIGRA bei Kindern wird häufig von „unschlüssigen“ Ergebnissen („indeterminate results“) bei jüngeren Kindern berichtet, die in der vorliegenden Studie lediglich in 5 von 639 Fällen (2 Kinder, 3 Erwachsene) beobachtet wurden und daher insgesamt seltener auftraten. Hierbei handelt es sich grundsätzlich um nicht auswertbare Ergebnisse, die entweder auf einer zu hohen Reaktivität in der Negativkontrolle oder auf einer mangelnden Reaktivität in der Positivkontrolle beruhen. Die Ursache unschlüssiger Ergebnisse bei Kindern wird in den meisten Studien nicht spezifiziert, ist jedoch in aller Regel auf eine unzureichende Reaktion in der Positivkontrolle zurückzuführen (SOYSAL et al., 2008; BERGAMINI et al., 2009; ZRINSKI TOPIC et al., 2011), was auf eine generell eingeschränkte Immunreaktivität im frühen Kindesalter hinweist. Der geringere Anteil von unschlüssigen Ergebnissen in unserer Studie könnte an der Wahl des zur polyklonalen Stimulation verwendeten Antigens liegen. In dieser Arbeit wurde als Positivkontrolle *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) verwendet, während in den kommerziellen Tests PHA als Positivkontrolle dient. Wenngleich bei einer Stimulation mit PHA ein höherer Anteil von aktivierten CD69 positiven T-Zellen zu finden ist als bei SEB (HUTCHINSON et al., 1999; LEWINSOHN et al., 2004) ist aus Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bei Erwachsenen bekannt, dass eine Stimulation mit PHA häufiger unschlüssige Ergebnisse

liefert als eine Stimulation mit SEB (Sester *et al*, nicht veröffentlicht). Bei der Verwendung von SEB bei Kindern zeigte sich zwar, dass der prozentuale Anteil reaktiver CD4 Zellen bei Kindern unter 5 Jahren signifikant geringer war als bei älteren Kindern und Erwachsenen. Allerdings lag die Reaktivität nur bei zwei von insgesamt 129 Kindern unterhalb der Nachweisgrenze. Hier gibt die kombinierte Analyse von IFN γ und IL-2 Hinweise, dass die alleinige Analyse von IFN γ möglicherweise unzureichend ist, um eine Immunreaktion im Kindesalter vollständig zu erfassen. Bei einem der beiden Kinder im Alter von 0.11 Jahren lag eine deutliche Produktion von IL-2 vor, was gegen eine generelle Immuninkompetenz spricht. Die T-Zell Frequenz bei einem weiteren Kind im Alter von 15.34 Jahren lag zwar in der quantitativen Auswertung unterhalb der bei Erwachsenen ermittelten Nachweisgrenze, allerdings zeigten sich in der visuellen Auswertung der Dotplots bei wenigen Zellen eine hohe IFN γ und IL-2 Produktion, sodass diese Zellen grundsätzlich als reaktiv zu werten sind, und somit ebenfalls von einer Immunreaktivität auszugehen ist. Hier müssten größere Fallzahlen zeigen, ob bei jüngeren Kindern neue Grenzwerte zur Definition einer positiven Reaktion herangezogen werden müssen. Diese beiden Beispiele verdeutlichen den Vorteil der durchflusszytometrischen Analyse im Vergleich zu den kommerziellen TIGRA. Durch die Möglichkeit einer zusätzlichen visuellen Auswertung der Reaktivität auf Einzelzellniveau lässt sich vor allem bei insgesamt geringer IFN γ Produktion dennoch eine bessere Bewertung der Immunantwort vornehmen. Zusätzlich kann die zusätzliche Analyse weiterer Zytokine, insbesondere das früh während einer Primärinfektion gebildete IL-2, die Sensitivität des Nachweises einer Immunantwort erhöhen (s. auch Abschnitt 5.5).

Lassen sich anhand der aktuellen Studienlage bei Kindern Unterschiede im Auftreten von unschlüssigen Ergebnissen zwischen den kommerziellen TIGRA feststellen? In einer britischen Studie wurde die Anwendung der NICE-Guidelines bei 120 Kindern anhand des THTs und des QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT-G-IT) Tests verglichen. Von 7 Kindern mit unschlüssigen QFT-G-IT Ergebnissen waren 6 Kinder unter 5 Jahren und eines dieser Kinder zeigte einen positiven THT (TAYLOR *et al.*, 2008). Leider wurden die Gründe für unschlüssigen Ergebnisse nicht spezifiziert. Eine türkische Studie untersuchte 209 Kinder im Alter von 6 bis 10 Jahren mit dem T-SPOT.TB Assay und beobachtete 5 unschlüssige Ergebnisse aufgrund fehlender Antwort in der Positivkontrolle (SOYSAL *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie, einem Vergleich von THT, QFT-G-IT und T-SPOT.TB, traten bei Kindern unter 3 Jahren häufiger unschlüssige Ergebnisse auf als bei älteren Kindern. Unschlüssige Ergebnisse traten besonders beim T-SPOT.TB auf. Dies wird zwar auf erschwerte Testanwendung im Vergleich zum QFT-G-IT, und somit vermehrte Laborfehler

zurückgeführt (CONNELL et al., 2008), aber hierfür gibt es in Studien bei Erwachsenen keinen Hinweis. Eine weitere Studie mit 496 Kindern zeigte beim qualitativen Vergleich von QuantiFERON-TB Gold, QuantiFERON-TB Gold in Tube und T-SPOT.TB eine signifikant höhere Anzahl von unschlüssigen Ergebnissen für beide QuantiFERON-Formate im Vergleich zum T-SPOT.TB. Diese traten gehäuft bei Kindern unter 4 Jahren auf. Bei der quantitativen Betrachtung fiel eine signifikant geringere IFN γ Produktion in der Positivkontrolle der QuantiFERON-TB Tests bei jüngeren Kindern auf. Eine entsprechende geringere Spot-Zahl im T-SPOT.TB Assay konnte demgegenüber nicht festgestellt werden (BERGAMINI et al., 2009). Deckungsgleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte eine weitere Studie zur Anwendung des QuantiFERON Assays bei 237 Kindern einen linearen Anstieg der IFN γ Produktion mit zunehmendem Alter (HAUSTEIN et al., 2009). Unschlüssige Ergebnisse wurden jedoch sehr viel häufiger beobachtet (in 35% aller Fälle) und traten vorwiegend bei jüngeren Kindern sowie bei Kindern mit Immundefizienz auf (HAUSTEIN et al., 2009), was auf eine höhere Sensitivität des durchflusszytometrischen Verfahrens schließen lässt. Ähnliche Ergebnisse (7,56% unschlüssige Ergebnisse) zeigte auch eine weitere aktuelle Studie in Bezug auf die IFN γ Antwort bei der Anwendung des QFT-G-IT bei Kindern (THOMAS et al., 2011).

Neben einem erhöhten Anteil an unschlüssigen Ergebnissen scheinen im frühen Kindesalter auch gehäuft diskordante Ergebnisse zwischen TIGRA und THT vorzukommen (HILL et al., 2006a; KAMPMANN et al., 2009), was zum Teil auch generell auf die Verwendung unterschiedlicher Antigene zurückgeführt werden kann (ESAT-6/CFP-10 versus PPD). Weitere potentiell zugrundeliegende immunologische Mechanismen dieser diskordanten Ergebnisse sind bislang noch nicht aufgeklärt, könnten jedoch zur Verbesserung von *in vitro* Verfahren bei Kindern beitragen. Darüberhinaus müssen prospektive Studien durchgeführt werden, die Informationen über den positiv prädiktiven Wert beider Verfahren zur Entwicklung einer Tuberkulose liefern.

Zusammenfassend lässt sich keine eindeutige Überlegenheit einer der beiden kommerziellen TIGRA feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei ausgewählten Proben ein Vergleich mit den kommerziellen TIGRA durchgeführt, deren Ergebnisse mit denen des durchflusszytometrischen Verfahrens übereinstimmten. Durch die Notwendigkeit der Zellisolierung war der T-SPOT.TB Assay zwar aufwändiger als die Vollblut basierten Verfahren, allerdings scheint die Normierung auf 250000 PBMCs pro Stimulationsreaktion einen Vorteil bei Probanden mit Lymphopenie darzustellen.

Die Problematik des erhöhten Anteils unschlüssiger Ergebnisse bei jüngeren Kindern spiegelt sich auch in den aktuellen CDC-Guidelines wieder. Hier wird empfohlen, dass der THT gegenüber den TIGRA bei Kindern unter 5 Jahren bevorzugt werden soll. Gründe hierfür sind neben der Problematik der unschlüssigen Ergebnisse in erster Linie die noch unzureichende Kenntnis des positiv prädiktiven Wertes von TIGRA, eine Tuberkulose zu entwickeln (MAZUREK et al., 2010).

Welche Erklärungen gibt es für die geringen IFN γ Spiegel bei Kindern? Es liegt nahe, dass die eingeschränkte Reaktion in der Positivkontrolle auf dem noch unzureichend entwickelten Immunsystem bei jüngeren Kindern beruht. Bei Nabelschnurblutproben zeigte sich, dass die unzureichende IFN γ Produktion nach PHA Stimulation hauptsächlich auf eine funktionelle Unreife der zur Stimulation notwendigen Makrophagen zurückzuführen ist (TAYLOR, BRYSON, 1985). Doch sollte dadurch nicht auch die THT-Reaktion negativ beeinflusst werden? Eine amerikanische Studie mit 207 Kindern konnte beim Vergleich von THT und QFT belegen, dass die IFN γ Konzentrationen auf PHA-Stimulation signifikant mit dem Alter korrelierte. Diese Unterschiede scheinen jedoch beim Hauttest nicht so stark ausgeprägt zu sein, denn ein Drittel der unter 2-Jährigen wies bei negativen QFT ein positives THT-Ergebnis auf. Nach Ausschluss einer BCG-Impfung als Ursache dieser Diskrepanz verblieben noch 9 Fälle, von denen 8 ein Expositionsrisiko aufwiesen (LIGHTER et al., 2009). Eine Erklärung für die schlechtere QFT Reaktivität könnte sein, dass bei jüngeren Kindern die Immunantwort eher durch Th2- als durch Th1-Zellen dominiert wird (LEWINSOHN et al., 2004), so dass ein alleinig auf IFN γ beruhender Nachweis einer Immunreaktion kein suffizientes Diagnostikum im frühen Kindesalter darstellt. Demgegenüber basiert die Immunreaktion im Hauttest auf einer lokalen Entzündungsreaktion, die sich aus einer Vielzahl an proinflammatorisch und chemotaktisch wirksamen Zytokinen zusammensetzt (ANDERSEN et al., 2000; MACK et al., 2009). Stellt sich diese Annahme als richtig heraus, so könnte durch die Analyse anderer Zytokine *in vitro* eine höhere Sensitivität und eine Steigerung der Korrelation zwischen THT und *in vitro* Tests erreicht werden (siehe auch Abschnitt 5.5).

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob sich eine Immunantwort bei gesichertem Kontakt mit einem Erreger durch eine IFN γ Produktion nachweisen lässt oder ob die eingeschränkte Immunreaktivität auf eine generell fehlende Fähigkeit zur IFN γ Produktion in dieser Altersgruppe zurückzuführen ist. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur durchflusszytometrischen Analyse der CMV spezifischen T-Zell Reaktivität bei Säuglingen und Kleinkindern zeigen, dass sich bei einer gesicherten CMV-Infektion durchaus IFN γ

produzierende spezifische T-Zellen nachweisen lassen (Ritter et al, in Vorbereitung). Ähnliches scheint auch für mycobakterielle Antigene wie PPD zuzutreffen, da 5 von 6 getesteten Kindern mit stattgehabtem *M. tuberculosis* Kontakt auch eine IFN γ -Reaktion auf PPD *in vitro* zeigten (Tabelle 7). Das Kind mit negativem Ergebnis zeigte dabei auch einen negativen THT, so dass bei Verwendung von Tuberkulin beide Verfahren übereinstimmende Ergebnisse zeigten. Ob dieses Kind, welches im Rahmen einer Umgebungsuntersuchung rekrutiert wurde, nennenswert exponiert war, ist dabei nicht gesichert, so dass es sich bei diesem Kind auch um ein tatsächlich negatives Ergebnis handeln könnte. Zusammenfassend lassen diese Daten den Schluss zu, dass selbst jüngere Kinder nach Antigenkontakt die Fähigkeit zur IFN γ Produktion entwickeln. Weitere Studien, vorzugsweise in einem Hoch-Prävalenz-Gebiet, müssen klären, ob dies auch für die Verwendung der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 gilt.

5.2 Vorteile der Untersuchung der PPD Reaktivität *in vitro*

Eine PPD Reaktivität kann sowohl auf einem Kontakt mit *M. tuberculosis*, auf BCG Impfung oder auf einem Kontakt mit NTM beruhen. Durch die erhöhte Spezifität der TIGRA zur Diagnostik einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* könnte der THT in nächster Zeit zumindest bei Erwachsenen in Niedrig-Prävalenzregionen in den Hintergrund rücken (WHO, 2011). Wenngleich das im Hauttest verwendete PPD bei den kommerziellen TIGRA nicht als Stimulus enthalten ist, bietet eine zusätzliche *in vitro* Stimulation mit PPD insbesondere bei fehlender Reaktivität auf ESAT-6 oder CFP-10 Hinweise auf eine BCG-Impfantwort oder eine NTM-Infektion. Zu diesem Zwecke bietet die PPD Stimulation *in vitro* im Vergleich zum THT ebenfalls logistische Vorteile, da die Analyse zeitgleich mit den *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen aus einer Blutprobe vorgenommen werden kann.

In dieser Arbeit zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg PPD reaktiver CD4 T-Zellen mit zunehmendem Alter kommt. Der geringe Anteil positiver Probanden im Kindesalter lässt sich durch einen bisher fehlenden Kontakt zu Mycobakterien in jungen Jahren erklären, der mit zunehmendem Alter wahrscheinlicher wird. Zusätzlich kann die PPD Reaktivität in höheren Altersgruppen zum Teil auf die bis 1998 empfohlene BCG-Impfung zurückgeführt werden. Bereits eine historische Veröffentlichung der Wiener Medizinischen Wochenschrift von Dr. C. von Pirquet aus dem Jahre 1907 zeigte, dass eine durch PPD hervorgerufene THT-Reaktion bei klinisch nicht tuberkuloseverdächtigen Kindern mit steigendem Alter stärker nachweisbar wird. Wenngleich damals eine positive Reaktion in deutlich mehr Fällen nachweisbar war, deckt sich der Verlauf der Zunahme in der PPD Reaktivität mit dem in

dieser Studie gemessenen altersabhängigen Anstieg. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Kindern lag in der Mehrzahl der Fälle keine BCG-Impfung vor, da diese seit 1998 in Deutschland nicht mehr empfohlen wird. Somit liegt es nahe, dass ein Großteil der PPD Reaktionen auf NTM-Infektionen zurückzuführen ist, die ebenfalls mit einem positiven THT assoziiert sind (DETJEN et al., 2007). Zur Epidemiologie der NTM-Infektionen gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Eine Arbeit aus Schweden spricht von einer Inzidenz von 4.5/100.000 bei Kindern (THEGERSTROM et al., 2008), eine andere Arbeit aus Großbritannien von einer Inzidenz von 1.95/100.000 bei Erwachsenen (HENRY et al., 2004). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2006 schätzt die Prävalenz eines durch NTM-Kontakt falsch positiven THT-Ergebnisses auf lediglich zwischen 0,1% in Montreal und Frankreich und 2,3% in Indien (FARHAT et al., 2006). In einer aktuellen Studie wurden diskordante Ergebnisse zwischen THT und TIGRA gezielt durch eine Stimulation mit *M. avium* Antigenen untersucht (LATORRE et al., 2010). Hier konnte immerhin bei 47,6% der THT positiven und ELISPOT (ESAT-6 und CFP-10) negativen Kinder eine spezifische Immunantwort gegen *M. avium* nachgewiesen werden. Es bestand signifikant häufiger eine Immunantwort gegen *M. avium* als gegen ESAT-6 oder CFP-10, sodass davon auszugehen ist, dass ein positives THT Ergebnis zumindest bei Kindern häufiger auf NTM als auf einen stattgehabten Kontakt mit *M. tuberculosis* zurückzuführen ist (LATORRE et al., 2010). Dies verdeutlicht, dass durch die Anwendung von TIGRA, möglicherweise ergänzt durch Antigene anderer Spezifitäten, eine unnötige Chemoprophylaxe vermieden werden kann.

Ein weiteres praktisches Problem der PPD Untersuchung durch den THT stellt sich durch die in zahlreichen Guidelines empfohlene zweistufige Tuberkulosedagnostik im Rahmen einer Umgebungsuntersuchung dar. Hiernach soll zunächst der Hauttest durchgeführt und lediglich ein positives Ergebnis nachfolgend durch einen TIGRA bestätigt werden. Dieses Zwei-Stufen-Modell wird in europäischen Ländern wie Großbritannien, Italien, Schweiz, Niederlande und Norwegen, aber auch in Kanada und Korea empfohlen (MACK et al., 2009). Seit 2007 galt diese Empfehlung auch für Deutschland (DIEL et al., 2007). Im Jahre 2011 wurden die Empfehlungen jedoch dahingehend aktualisiert, dass das zweistufige Verfahren durch den sofortigen Einsatz von TIGRA bei Patienten über 15 Jahren abgelöst wird (DIEL et al., 2011c). Dies ist zum einen auf den geringeren positiven prädiktiven Wert des THT im Vergleich zu TIGRA zurückzuführen (DIEL et al., 2008; DIEL et al., 2011a; DIEL et al., 2011b). Des Weiteren kann es beim Einsatz des THT zu einem Boosting-Effekt kommen, bei dem die intracutane PPD Injektion zu einer Stimulierung der Immunabwehr *in vivo* führt. Dies könnte somit bei einem später durchgeführten THT als auch bei einer TIGRA-

Untersuchung zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Die bisher veröffentlichten Studien ergeben kein einheitliches Ergebnis, ob und wie lange dieser Boosting-Effekt nach Anwendung des THT bestehen bleibt (RICHELDI et al., 2006; LEYTEN et al., 2007; NASEER et al., 2007; VAN ZYL-SMIT et al., 2009). Dies wäre insbesondere am Tag 3 nach PPD Injektion relevant, da dies der Zeitpunkt darstellt, an dem der THT abgelesen und laut Stufenmodell gegebenenfalls ein TIGRA durchgeführt werden sollte. Wie groß die Zahl von falsch-positiven TIGRA-Ergebnissen durch den Boosting-Effekt ist und welcher Zeitpunkt geeignet für die TIGRA-Untersuchung ist, müssen weitere Studien belegen. Die *in vitro* Untersuchung der PPD spezifischen Immunantwort stellt einen weiteren Ansatz zur Vermeidung des Boosting-Effekts dar. Dadurch könnte die PPD Immunantwort auch im Verlauf der Therapie untersucht werden, ohne durch mehrmalige Anwendung des THT einen Boosting-Effekt auszulösen.

5.3 Dominanz der ESAT-6 Reaktivität bei Kindern

Unsere Untersuchungen bei Erwachsenen haben gezeigt, dass Probanden mit einer spezifischen T-Zellreaktivität gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und/oder CFP-10 in aller Regel auch eine nachweisbare CD4 T-Zellantwort gegen das PPD Antigen aufweisen, deren Frequenz die der ESAT-6 oder CFP-10-spezifischen T-Zellen übersteigt (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit war dagegen auffällig, dass bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen häufiger eine isolierte Reaktivität gegen ESAT-6 vorlag. Bei Kindern und Jugendlichen unter 20 Jahren war in 30% der Fälle die Immunantwort gegen ESAT-6 stärker als die Immunantwort gegen PPD. Dies ist eine interessante Beobachtung, welche in anderen Studien bisher kaum beschrieben wurde, da bei Verwendung der kommerziellen TIGRA in der Regel keine Vergleichsuntersuchung mit dem PPD Antigen durchgeführt wird. Des Weiteren wird bei den kommerziellen TIGRA nicht zwischen den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen unterschieden, da beim QFT die Antigene ESAT-6 und CFP-10 gemeinsam in einem Stimulationsansatz untersucht werden. Beim T-SPOT.TB wird die Immunantwort zwar einzeln untersucht, allerdings wird in den meisten Fällen keine getrennte Auswertung beschrieben.

Es gibt wenige Studien, welche eine vergleichende Untersuchung der Immunantwort nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen untersucht und berichtet haben. Im Vergleich zu dieser Arbeit beschränken sich die Aussagen jedoch im wesentlichen auf Kinder mit LTBI und aktiver Infektion. Eine Studie in einem Hochprävalenzgebiet untersuchte die IFN γ Produktion gegen die Antigene PPD, ESAT-6 und CFP-10 von BCG-geimpften Kindern mit

LTBI bzw. aktiver Tuberkulose im Vergleich zu gesunden Kindern. ROC Analysen zeigten, dass alleinig bei Verwendung von ESAT-6 eine Unterscheidung zwischen LTBI/aktiv infizierten Kindern und nicht-infizierten Kontrollen möglich war (VAN-LUME et al., 2010). Folglich könnten diese Daten einen Hinweis für die besondere Bedeutung von ESAT-6 bei der Beurteilung des Infektgeschehens liefern. In einer weiteren Studie wurde die PPD und ESAT-6 Reaktivität bei Kindern mit LTBI und aktiver Tuberkulose verglichen. Diese zeigte jedoch ähnlich wie bei Erwachsenen eine signifikant stärkere Immunantwort gegen PPD im Vergleich zu ESAT-6 (LIGHTER-FISHER et al., 2010). Somit bleibt aktuell unklar, ob der in unserem Kollektiv von gesunden Kindern beobachtete Nachweis einer Immunantwort gegen ESAT-6 bei gleichzeitig fehlender oder schwächerer Reaktivität gegen PPD mit einem stattgehabten Kontakt zu *M. tuberculosis* korreliert oder ob es sich um eine unspezifische Kreuzreaktivität handelt könnte. Hierzu sind weitere Studien nötig, die zusätzlich auch eine detaillierte Analyse der Immunreaktivität auf PPD und die *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene bei den kommerziellen TIGRA einschließen sollte.

5.4 Die Anwendung von TIGRA bei Kindern mit cystischer Fibrose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendung von TIGRA bei chronisch kranken Kindern zu untersuchen. Da Patienten mit cystischer Fibrose ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Infektion mit NTM besitzen (FIELD, COWIE, 2006; FOWERAKER, 2009), wurden zum einen Kinder mit dieser Grunderkrankung eingeschlossen. Zudem wurden Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen rekrutiert, da diese in aller Regel eine immunsuppressive Therapie erhalten und häufig mit TNF α -Antagonisten therapiert werden. Unter dieser Therapie kommt es deutlich häufiger zu einer Reaktivierung einer vorbestehenden latenten Infektion mit *M. tuberculosis* (KEANE et al., 2001). Daher wird vor Beginn einer solchen Therapie ein Screening auf eine latente Infektion mit Chemoprophylaxe im Falle eines positiven Ergebnisses empfohlen. Das Screening umfasst eine gründliche klinische Untersuchung, eine Röntgen-Thorax-Untersuchung sowie ein THT (2005). Da jedoch die meisten CED-Patienten vor Beginn einer TNF α -Therapie bereits unter immunsuppressiver Therapie mit z.B. Azathioprin oder Methotrexat stehen und der THT bekanntermaßen eine eingeschränkte Sensitivität unter Immunsuppression aufweist (siehe Abschnitt 2.4.2), wird häufig empfohlen nach Nutzen-Risiko-Abwägung eine Chemoprophylaxe ohne THT durchzuführen (2005).

Vor dem Hintergrund der geringen Spezifität des THT wird deutlich, dass durch eine verbesserte Tuberkulosedagnostik bei vielen dieser Patienten auf eine unnötige Chemoprophylaxe verzichtet werden könnte. Auf der anderen Seite jedoch profitieren gerade diese Patienten mit einem stark erhöhten Risiko zur Reaktivierung einer LTBI von einer präventiven Therapie, so dass keiner dieser Patienten als falsch negativ diagnostiziert werden sollte. Der THT liefert vor allem bei immunsupprimierten Patienten häufig falsch negative Ergebnisse. Bisherige Studien lassen schließen, dass TIGRA auch in dieser Patientengruppe zur spezifischeren und sensitiveren Diagnose einer latenten Infektion geeignet sind, wenngleich entsprechende Untersuchungen bislang nur bei Erwachsenen durchgeführt wurden (PIANA et al., 2006; SCHOEPFER et al., 2008; MORI, 2009; QUMSEYA et al., 2010; SOLOVIC et al., 2010). So zeigte eine amerikanische Studie an 340 erwachsenen Patienten vor Beginn und unter Therapie mit TNF α Antagonisten keinen höheren Anteil von unschlüssigen Ergebnissen unter Screening mit dem QuantiFERON TB Gold Assay. Dennoch erkrankte ein Patient, welcher ein unschlüssiges Ergebnis aufwies, unter Immunsuppression an Tuberkulose. Eine weitere Studie an 168 CED-Patienten im Vergleich zu 44 Gesunden mittels THT und QuantiFERON TB Gold in Tube (QFT-G-IT) zeigte, dass sich die Anzahl positiver QFT-G-IT nicht zwischen den CED-Patienten und der Kontrollgruppe unterschied. 3% der CED-Patienten zeigten allerdings ein unschlüssiges Ergebnis. Bei CED-Patienten bestand im Vergleich zur immungesunden Kontrollgruppe keine Korrelation zwischen THT und QFT-G-IT, denn nur 2 von 14 CED-Patienten mit einem positiven QFT-G-IT zeigten auch ein positives THT-Ergebnis. 11 dieser Patienten standen unter immunsuppressiver Therapie (SCHOEPFER et al., 2008). Dies lässt schließen, dass TIGRA in geringerem Ausmaß durch immunsuppressive Medikamente beeinflusst werden als der THT, was durch Analyse der Wirkung von Immunsuppressiva *in vitro* bestätigt wird (SESTER et al., 2009).

Bislang gibt es keine Studie zur Anwendung der *in vitro* Verfahren bei Kindern mit CED oder CF. Wenngleich in der vorliegenden Arbeit keine Kinder mit spezifischen Risikofaktoren einer Tuberkulose untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass es bei allen verwendeten Antigenen keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Kindern und Kindern mit CED oder CF gibt. Dies gilt sowohl für den Anteil einer positiven Reaktion als auch die Frequenz reaktiver Zellen. Besonders interessant war die Analyse der mit dem polyklonalen Stimulus SEB behandelten Proben, die einen Hinweis auf eine generell eingeschränkte Immunfunktion hätte liefern können und die bei kommerziellen TIGRA oftmals ein Grund für unschlüssige Ergebnisse bei immunsupprimierten Patienten darstellen. In dieser Arbeit konnte

jedoch kein Anhalt für eine unzureichende Immunfunktion bei CED- oder CF-Patienten gefunden werden.

Zusammenfassend geben die Daten dieser Arbeit keinen Anhalt für eine geringere Sensitivität des durchflusszytometrischen Verfahrens bei Kindern mit CED oder CF. Leider ist die untersuchte Patientenzahl sehr gering, sodass kein Vergleich von CED-erkrankten Kindern ohne und mit immunsuppressiver Therapie erfolgte. Des Weiteren wurden keine Kinder mit bekanntem Risiko einer Infektion erfasst. Darüberhinaus sind sowohl bei Kindern wie auch bei Erwachsenen weitere Studien zum positiv prädiktiven Wert der TIGRA vonnöten. Bis zum Vorliegen weiterer Studien wird bei Kindern derzeit die kombinierte Durchführung von THT und TIGRA empfohlen (SOLOVIC et al., 2010).

5.5 IL-2 als zusätzlicher Marker zum Reaktivitätsnachweis

Vor dem Hintergrund der Beobachtung, dass es bei Verwendung kommerzieller TIGRA bei Kindern unter 5 Jahren gehäuft zu unschlüssigen Ergebnissen kommt, wurde in dieser Arbeit zusätzlich zu IFN γ auch die IL-2 Produktion nach spezifischer Stimulation untersucht. Es konnte eine deutliche Korrelation zwischen IL-2 und IFN γ nachgewiesen werden. Vor allem bei jüngeren Kindern konnten im Vergleich zu IFN γ mehr IL-2 produzierende Zellen nachgewiesen werden. Gerade bei den niedrigen Frequenzen der unter 5-Jährigen (siehe Abschnitt 5.1) könnte IL-2 einen weiteren Parameter zum Nachweis reaktiver T-Zellen darstellen. Hierdurch könnte der Anteil von unschlüssigen Ergebnissen bei Kindern möglicherweise gesenkt werden.

Ein weiterer Vorteil der zusätzlichen Analyse von IL-2 ergibt sich durch die Möglichkeit, Probanden mit latenter Infektion von Patienten mit aktiver Tuberkulose zu unterscheiden. Dies ist alleinig auf Basis IFN γ basierter TIGRA nicht möglich. So zeigte eine Studie aus Großbritannien mit 209 Kindern, 91 mit aktiver und 118 mit latenter Tuberkulose keinen Sensitivitätsvorteil der TIGRA im Vergleich zum THT bei der Diagnose einer aktiven Tuberkulose (KAMPMANN et al., 2009). Dies wurde auch in einer Metaanalyse, die sowohl Kinder als auch Erwachsene umfasste, bestätigt (SESTER et al., 2011a). Interessanterweise konnte durch Analyse von Zytokinprofilen gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Kontrolle der Infektion mit *M. tuberculosis* mit einem multifunktionalen Zytokinprofil assoziiert ist, während die spezifische Immunantwort bei Patienten mit aktiver Tuberkulose durch einen Verlust in der Produktion von IL-2 gekennzeichnet ist (MILLINGTON et al., 2007; SARGENTINI et al., 2009; SUTHERLAND et al., 2009; BISELLI et al.; HARARI et al., 2011; SESTER et al., 2011b).

Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass die Immunantwort bei immungesunden Kindern bzw. Kindern mit nachweisbarer PPD Reaktivität ähnlich wie bei Erwachsenen durch IFN γ /IL-2 doppelpositive T-Zellen dominiert war. Leider standen jedoch in der Laufzeit dieser Arbeit nicht genügend Fälle einer aktiven Tuberkulose bei Kindern zur Verfügung, um Veränderungen im Zytokinprofil auch für Kinder belegen zu können. Dementsprechend müssen weitere Studien der Frage nachgehen, ob durch die Untersuchung spezifischer Zytokinmuster in ähnlicher Weise wie bei Erwachsenen eine suffiziente Diskriminierung zwischen einem aktiven Geschehen und einer latenten Infektion möglich ist. In diesem Fall ergäbe sich ein deutlicher Vorteil der durchflusszytometrischen Tuberkulosedagnostik im Vergleich zu den kommerziellen TIGRA.

5.6 Kein diagnostischer Gewinn durch die Anwendung von serologischen Tests

In dieser Arbeit wurden sowohl ELISA-basierte Antikörpernachweisverfahren als auch ein chromatographischer Schnelltest untersucht. Es zeigte sich zwar eine geringe Korrelation zwischen den ELISA-basierten AK-Nachweisen (IgG, IgA, IgM), doch kein Wert lag oberhalb der Nachweisgrenze. Dies galt auch für die Kinder mit aktiver Tuberkulose. Zudem war beim Ablesen der Banden der chromatographischen Schnelltests eine deutliche Varianz bei unterschiedlichen Ablesern zu beobachten, was die generelle Aussagekraft ebenfalls erschwerte. Bei der Analyse der IgM Titer im chromatographischen TB-GAM Rapid Tuberculosis Test zeigten sich zwar überdurchschnittlich häufig positive Reaktionen, aber auch diese zeigten keinerlei Assoziation mit der Aktivität der Erkrankung.

Abschließend konnte keine eindeutige Verwendung serologischer Nachweisverfahren zur Tuberkulosediagnose belegt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen aktueller systematischer Reviews und Metaanalysen zur Evaluation serologischer Tests zur Diagnostik einer pulmonalen oder extrapulmonalen Tuberkulose. Zusammenfassend zeigte sich, dass keiner der untersuchten serologischen Tests eine ausreichend hohe Sensitivität aufwies, um eine Sputum-Mikroskopie zu ersetzen (DINNES et al., 2007; STEINGART et al., 2007a, b; STEINGART et al., 2009). Vor diesem Hintergrund hat sich die WHO explizit gegen die Verwendung von AK-basierten Verfahren zur Diagnose einer latenten oder aktiven Infektion mit *M. tuberculosis* ausgesprochen (MORRIS, 2011).

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der durchflusszytometrische Nachweis $\text{IFN}\gamma$ produzierender CD4 T-Zellen zur Diagnostik einer latenten Tuberkulose bei Erwachsenen als auch bei Kindern durchgeführt werden. Hierbei ergab sich mit zunehmendem Alter ein signifikanter Anstieg von PPD reaktiven T-Zellen. Auch die Reaktion auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene zeigte eine mit dem Alter steigende Tendenz, wobei die Immunantwort bei Kindern von einer Reaktion gegen das ESAT-6 Antigen dominiert war. Kinder unter 5 Jahren zeigten zwar eine geringere Anzahl reaktiver Zellen in der Positivkontrolle, doch lag nur eines von 18 Kindern unterhalb der Nachweisgrenze. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede in der diagnostischen Aussagekraft bei Kindern mit chronischen entzündlichen Darmerkrankungen oder cystischer Fibrose im Vergleich zu gesunden Kindern gefunden werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich der hier vorgestellte Durchflusszytometrie-basierte TIGRA sowohl bei gesunden Kindern als auch Kindern mit chronischen Erkrankungen durchführen lässt. Das durchflusszytometrische Testverfahren lässt sich im Vergleich zu den kommerziellen TIGRA mit sehr geringen Blutvolumina durchführen und bietet die Möglichkeit, zusätzliche diagnostische Marker zu untersuchen. Zukünftige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe widmen sich der Ausweitung dieser Untersuchungen auf Kinder im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen oder auf Kinder mit aktiver Tuberkulose, um die Wertigkeit des durchflusszytometrischen Verfahrens bei Kindern in Tuberkulose-Risikosituationen zu evaluieren.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IFN γ Nachweismethoden von links nach rechts.	17
Abbildung 2: Dotplot Darstellung der lichtbrechenden Eigenschaften von Blutzellen	30
Abbildung 3: Gating-Strategie zur Identifizierung Antigen spezifischer CD4 T-Zellen	32
Abbildung 4: Typisches Ergebnis eines positiven T-SPOT. <i>TB</i>	36
Abbildung 5: Repräsentative FACS-Diagramme mit prozentualen Anteil der PPD , ESAT-6 und CFP-10 spezifischen CD4 T-Zellen.....	40
Abbildung 7: Eine deutliche SEB Reaktion ist in allen Altersgruppen nachweisbar.	45
Abbildung 8: Die ESAT-6 und CFP-10 Reaktivität zeigen einen steigenden Trend mit zunehmendem Alter.	46
Abbildung 9: Die PPD Reaktivität unterscheidet sich nicht zwischen gesunden und chronisch erkrankten Kindern.	48
Abbildung 10: Die ESAT-6/CFP-10 Reaktivität unterscheiden sich nicht zwischen gesunden und chronisch erkrankten Kindern.	49
Abbildung 11: Reaktivitätsvergleich von Kinder und Erwachsenen mit chronischen Erkrankungen	50
Abbildung 12: Dominanz der ESAT-6 Reaktivität bei Kindern	52
Abbildung 13: Es lässt sich keine sinnvolle Korrelation der Antikörper erkennen.	53
Abbildung 14: IL-2 ist stärker nachweisbar als IFN γ	54
Abbildung 15: Beim Nachweis einer Reaktivität gegen <i>M. tuberculosis</i> bietet IL-2 keine diagnostischen Vorteile.	54
Abbildung 16: Die Untersuchung eines Patienten mit NTM-Infektion mittels verschiedener Nachweisverfahren.....	56

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien zur Stimulation spezifischer T-Zellen	25
Tabelle 2: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von T-Zellen	25
Tabelle 3: Konzentration der Antigene	28
Tabelle 4: Konzentration der Antikörper	29
Tabelle 5: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome	30
Tabelle 6: Interpretation der QuantiFERON-TB Gold in Tube-Test Ergebnisse	34
Tabelle 7: Falldarstellung einzelner Patienten mit Kontakt zu <i>M. tuberculosis</i> mit klinischen Untersuchungsergebnissen und dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung.	42

8 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BFA	Brefeldin A
BSA	bovines Serumalbumin
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CF	cystische Fibrose
CFP-10	culture filtrate protein 10
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
ESAT-6	early secretory antigenic target 6
FACS	fluoreszenz assoziierte Zellsorting
FCS	fötales Kälber Serum
FSC	Forward Scatter

HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSA	humanes Serum Albumin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INH	Isoniazid
LTBI	Latente Tuberkuloseinfektion
MHC	major histocompatibility complex
NTM	nicht tuberkulöse Mycobakterien
OD	optische Dichte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PHA	Phytohämagglutinin
QFT-G-IT	QuantiFERON-TB Gold in Tube
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SSC	Side Scatter
TB	Tuberkulose
TCR	T-Zell-Rezeptor
THT	Tuberkulinhauttest
TIGRA≈IGRA	T-Zell Interferon γ release assay
TNF	Tumornekrosefaktor
Tuberkulin≈PPD	purified protein derivative
UPM	Umdrehung pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation

9 Literaturverzeichnis

1. (2000) Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection - Official Statement of the American Thoracic Society *Am J Respir Crit Care Med* 161:S221-247
2. (2005) BTS recommendations for assessing risk and for managing *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in patients due to start anti-TNF-alpha treatment. *Thorax* 60:800-805
3. Adetifa IM, Ota MO, Jeffries DJ, Hammond A, Lugos MD, Donkor S, Patrick O, Adegbola RA, Hill PC (2010) Commercial Interferon Gamma Release Assays Compared to the Tuberculin Skin Test for Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Childhood Contacts in the Gambia. *Pediatr Infect Dis J*
4. Anandaiah A, Dheda K, Keane J, Koziel H, Moore DAJ, Patel NR (2011) Novel developments in the epidemic of human immunodeficiency virus and tuberculosis coinfection. *Am J Respir Crit Care Med* 183:987-997
5. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356:1099-1104
6. Asherova IK, Feigelson J, Vasilyeva LA, Gabitov VJ (2006) Cystic fibrosis complicated by multiresistant tuberculosis. *Acta Paediatr* 95:1513-1514
7. Bakir M, Dosanjh DP, Deeks JJ, Soysal A, Millington KA, Efe S, Aslan Y, Polat D, Kodalli N, Yagci A, Barlan I, Bahceciler N, Demiralp EE, Lalvani A (2009) Use of T cell-based diagnosis of tuberculosis infection to optimize interpretation of tuberculin skin testing for child tuberculosis contacts. *Clin Infect Dis* 48:302-312
8. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri LM, Balli F, Richeldi L (2009) Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics* 123:e419-424

9. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B (1998) A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144 (Pt 11):3195-3203
10. Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F, Vanini V, Girardi E, Goletti D, R DA, Nisini R (2010) Detection of interleukin-2 in addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect* 16:1282-1284
11. Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan VP, Marino S, Kirschner DE, Huang L, Flynn J, Chan J (2008) Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infect Immun* 76:916-926
12. Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N, Ranganathan SC (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 3:e2624
13. Cruz AT, Geltemeyer AM, Starke JR, Flores JA, Graviss EA, Smith KC (2011) Comparing the tuberculin skin test and T-SPOT.TB blood test in children. *Pediatrics* 127:e31-38
14. Cruz AT, Starke JR (2010) Pediatric tuberculosis. *Pediatr Rev* 31:13-25; quiz 25-16
15. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 45:322-328
16. Diel R, Forssbohm M, Loytved G, Haas W, Hauer B, Maffei D, Magdorf K, Nienhaus A, Rieder HL, Schaberg T, Zellweger JP, Loddenkemper R (2007) [Recommendations for background studies in tuberculosis]. *Pneumologie* 61:440-455
17. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori GB, Nienhaus A, Ruhwald M, Wagner D, Zellweger JP, Huitric E, Sandgren A, Manissero D (2011a) Interferon- γ release assays for

- the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 37:88-99
18. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A (2008) Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1164-1170
 19. Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A (2011b) Negative and Positive Predictive Value of a Whole-Blood Interferon- γ Release Assay for Developing Active Tuberculosis: An Update. *Am J Respir Crit Care Med* 183:88-95
 20. Diel R, Loytved G, Nienhaus A, Castell S, Detjen A, Geerdes-Fenge H, Haas W, Hauer B, Konigstein B, Maffei D, Magdorf K, Priwitzer M, Zellweger JP, Loddenkemper R (2011c) [New recommendations for contact tracing in tuberculosis. German Central Committee against Tuberculosis]. *Pneumologie* 65:359-378
 21. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F, Lalvani A (2007) A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 11:1-196
 22. Falagas ME, Kouranos VD, Athanassa Z, Kopterides P (2010) Tuberculosis and malignancy. *Qjm* 103:461-487
 23. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D (2006) False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 10:1192-1204
 24. Field SK, Cowie RL (2006) Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest* 129:1653-1672
 25. Foweraker J (2009) Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 89:93-110
 26. Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM (2001) Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69:1722-1728

27. Gradmann C (2006) Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes Infect* 8:294-301
28. Haas W, Brodhun B, Starker A (2006). Tuberkulose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes., Institut RK, ed.
29. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, Cavassini M, Calandra T, Blanchet CL, Jaton K, Faouzi M, Day CL, Hanekom WA, Bart PA, Pantaleo G (2011) Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med* 17:372-376
30. Hauer B, Brodhun B, Altmann D, Bronnecke M, Loddenkemper R, Haas W (2008a) [Epidemiology of tuberculosis in the world and in Germany]. *Pneumologie* 62:583-594
31. Hauer B, Diel R, Priwitzer M, Rusch-Gerdes S, Schaberg T, Loddenkemper R (2008b) [The new tuberculosis rapid assay from DiaVita - no improvement of diagnostic]. *Pneumologie* 62:480-481
32. Hauer B, Loddenkemper R, Detjen A, Forssbohm M, Haas W, Loytved G, Magdorf K, Mauch H, Nienhaus A, Rieder HL, Sagebiel D, Schaberg T (2006) [Interferon-gamma assays -- description and assessment of a new tool in the diagnosis of tuberculosis]. *Pneumologie* 60:29-44
33. Haustein T, Ridout DA, Hartley JC, Thaker U, Shingadia D, Klein NJ, Novelli V, Dixon GL (2009) The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon-gamma release assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children correlates with age and immune status. *Pediatr Infect Dis J* 28:669-673
34. Henry MT, Inamdar L, O'Riordain D, Schweiger M, Watson JP (2004) Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J* 23:741-746
35. Hill PC, Brookes RH, Adetifa IM, Fox A, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, Marshall RJ, Howie SR, Corrah T, Jeffries DJ, Adegbola RA, McAdam KP (2006a)

- Comparison of enzyme-linked immunospot assay and tuberculin skin test in healthy children exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. *Pediatrics* 117:1542-1548
36. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Jeffries DJ, Donkor SA, Adegbola RA, McAdam KP (2006b) Surprisingly high specificity of the PPD skin test for *M. tuberculosis* infection from recent exposure in The Gambia. *PLoS ONE* 1:e68
 37. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Hauser W, Herrlinger K, Hohne W, Koletzko S, Kriegelstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M (2008) [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol* 46:1094-1146
 38. Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr. (1993) The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 17:968-975
 39. Hutchinson P, Divola LA, Holdsworth SR (1999) Mitogen-induced T-cell CD69 expression is a less sensitive measure of T-cell function than [(3)H]-thymidine uptake. *Cytometry* 38:244-249
 40. Janeway M, Travers, Walport (2008) *Janeway's Immunobiology*. seventh edition
 41. Kalsdorf B, Strassburg A, Greinert U, Lotz J, Lange C (2008) [Clinical features and diagnosis of tuberculosis]. *Pneumologie* 62:284-294
 42. Kampmann B, Whittaker E, Williams A, Walters S, Gordon A, Martinez-Alier N, Williams B, Crook AM, Hutton AM, Anderson ST (2009) Interferon-gamma release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Respir J* 33:1374-1382
 43. Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH (2010) New vaccines for tuberculosis. *Lancet* 375:2110-2119
 44. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM (2001) Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345:1098-1104

45. Lalvani A, Millington KA (2008) Screening for tuberculosis infection prior to initiation of anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 8:147-152
46. Lalvani A, Pareek M (2010) A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull* 93:69-84
47. Latorre I, De Souza-Galvao M, Ruiz-Manzano J, Lacombe A, Prat C, Altet N, Ausina V, Dominguez J (2010) Evaluating the non-tuberculous mycobacteria effect in the tuberculosis infection diagnosis. *Eur Respir J* 35:338-342
48. Leung CC, Rieder HL, Lange C, Yew WW (2011) Treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*: update 2010. *Eur Respir J* 37:690-711
49. Lewinsohn DA, Gennaro ML, Scholvinck L, Lewinsohn DM (2004) Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:658-674
50. Lewinsohn DA, Lobato MN, Jereb JA (2010) Interferon-gamma release assays: new diagnostic tests for *Mycobacterium tuberculosis* infection, and their use in children. *Curr Opin Pediatr* 22:71-76
51. Leyten EM, Prins C, Bossink AW, Thijsen S, Ottenhoff TH, van Dissel JT, Arend SM (2007) Effect of tuberculin skin testing on a *Mycobacterium tuberculosis*-specific interferon-gamma assay. *Eur Respir J* 29:1212-1216
52. Lighter-Fisher J, Peng CH, Tse DB (2010) Cytokine responses to QuantiFERON(R) peptides, purified protein derivative and recombinant ESAT-6 in children with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:1548-1555
53. Lighter J, Rigaud M (2009) Diagnosing childhood tuberculosis: traditional and innovative modalities. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 39:61-88
54. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H (2009) Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test. *Pediatrics* 123:30-37
55. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, Bossink A, Magdorf K, Holscher C, Kampmann B, Arend SM, Detjen A, Bothamley G, Zellweger JP,

- Milburn H, Diel R, Ravn P, Cobelens F, Cardona PJ, Kan B, Solovic I, Duarte R, Cirillo DM (2009) LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 33:956-973
56. Mazurek M, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59:1-25
57. Mendez-Echevarria A, Gonzalez-Munoz M, Mellado MJ, Baquero-Artigao F, Blazquez D, Penin M, Navarro ML, Saavedra-Lozano J, Teresa Hernandez-Sampelayo M, Isabel Gonzalez-Tome M, Calvo C, Ruiz Jimenez M, Tomas Ramos J, Guillen S, Velazquez R, Perez-Gorricho B, Martinez J, Perez E (2011) Interferon {gamma} release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection and tuberculosis disease in children. *Arch Dis Child*
58. Migliori GB, Raviglione MC, Schaberg T, Davies PD, Zellweger JP, Grzemska M, Mihaescu T, Clancy L, Casali L (1999) Tuberculosis management in Europe. Task Force of the European Respiratory Society (ERS), the World Health Organisation (WHO) and the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Europe Region. *Eur Respir J* 14:978-992
59. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A (2007) Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178:5217-5226
60. Mori T (2009) Usefulness of interferon-gamma release assays for diagnosing TB infection and problems with these assays. *J Infect Chemother* 15:143-155
61. Morris K (2011) WHO recommends against inaccurate tuberculosis tests. *Lancet* 377:113-114
62. Mow WS, Abreu-Martin MT, Papadakis KA, Pitchon HE, Targan SR, Vasiliauskas EA (2004) High incidence of anergy in inflammatory bowel disease patients limits the usefulness of PPD screening before infliximab therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2:309-313

63. Naseer A, Naqvi S, Kampmann B (2007) Evidence for boosting *Mycobacterium tuberculosis*-specific IFN-gamma responses at 6 weeks following tuberculin skin testing. *Eur Respir J* 29:1282-1283
64. Newton SM, Mackie SL, Martineau AR, Wilkinson KA, Kampmann B, Fisher C, Dutta S, Levin M, Wilkinson RJ, Pasvol G (2008) Reduction of chemokine secretion in response to mycobacteria in infliximab-treated patients. *Clin Vaccine Immunol* 15:506-512
65. NICE (2008) Guidelines for the Diagnosis of latent Tuberculosis in the 21th century. New Jersey Medical School Global Tuberculosis Institute
66. Olivier KN, Weber DJ, Lee JH, Handler A, Tudor G, Molina PL, Tomashefski J, Knowles MR (2003a) Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167:835-840
67. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr., Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR (2003b) Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:828-834
68. Pai M, Zwerling A, Menzies D (2008) Systematic Review: T-Cell-Based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med*
69. Paige C, Bishai WR (2010) Penitentiary or penthouse condo: the tuberculous granuloma from the microbe's point of view. *Cell Microbiol* 12:301-309
70. Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, Ferrarese M, Migliori GB, Barbarano L, Morra E, Cirillo DM (2006) Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J* 28:31-34
71. Podewils LJ, Holtz T, Riekstina V, Skripconoka V, Zarovska E, Kirvelaite G, Kreigere E, Leimane V (2011) Impact of malnutrition on clinical presentation, clinical course, and mortality in MDR-TB patients. *Epidemiol Infect* 139:113-120
72. Qumseya BJ, Ananthakrishnan AN, Skaros S, Bonner M, Issa M, Zadvornova Y, Naik A, Perera L, Binion DG (2010) QuantiFERON TB gold testing for tuberculosis

screening in an inflammatory bowel disease cohort in the United States. *Inflamm Bowel Dis*

73. Ratjen F (2009) Update in cystic fibrosis 2008. *Am J Respir Crit Care Med* 179:445-448
74. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Roversi P, Fabbri LM, Lalvani A (2006) Repeated tuberculin testing does not induce false positive ELISPOT results. *Thorax* 61:180
75. Richeldi L, Losi M, D'Amico R, Luppi M, Ferrari A, Mussini C, Codeluppi M, Cocchi S, Prati F, Paci V, Meacci M, Meccugni B, Rumpianesi F, Roversi P, Cerri S, Luppi F, Ferrara G, Latorre I, Gerunda GE, Torelli G, Esposito R, Fabbri LM (2009) Performance of Tests for Latent Tuberculosis in Different Groups of Immunocompromised Patients. *Chest*
76. Rylance J, Pai M, Lienhardt C, Garner P (2010) Priorities for tuberculosis research: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 10:886-892
77. Sargentini V, Mariotti S, Carrara S, Gagliardi MC, Teloni R, Goletti D, Nisini R (2009) Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 9:99
78. Schaberg T, Forssbohm M, Hauer B, Kirsten D, Kropp R, Loddenkemper R, Magdorf K, Rieder H, Sagebiel D, Urbanczik R (2001) [Guidelines for drug treatment of tuberculosis in adults and childhood]. *Pneumologie* 55:494-511
79. Schaberg T, Hauer B, Haas WH, Hohlfeld J, Kropp R, Loddenkemper R, Loytved G, Magdorf K, Rieder HL, Sagebiel D (2004) [Latent tuberculosis infection: recommendations for preventive therapy in adults in Germany]. *Pneumologie* 58:255-270
80. Schluger NW, Burzynski J (2010) Recent advances in testing for latent TB. *Chest* 138:1456-1463
81. Schoepfer AM, Flogerzi B, Fallegger S, Schaffer T, Mueller S, Nicod L, Seibold F (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 103:2799-2806

82. Sester M, Giehl C, McNerney R, Kampmann B, Walzl G, Cuchi P, Wingfield C, Lange C, Migliori GB, Kritski AL, Meyerhans A (2010) Challenges and perspectives for improved management of HIV/Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Eur Respir J* 36:1242-1247
83. Sester M, Sester U, Clauer P, Heine G, Mack U, Moll T, Sybrecht GW, Lalvani A, Kohler H (2004) Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 65:1826-1834
84. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, Bossink A, Dheda K, Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Huitric E, Sandgren A, Manissero D (2011a) Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 37:100-111
85. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M (2011b) Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PLoS One* 6:e17813
86. Sester U, Junker H, Hodapp T, Schutz A, Thiele B, Meyerhans A, Kohler H, Sester M (2006) Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy. *Nephrol Dial Transplant* 21:3258-3268
87. Sester U, Wilkens H, van Bentum K, Singh M, Sybrecht GW, Schafers HJ, Sester M (2009) Impaired detection of Mycobacterium tuberculosis immunity in patients using high levels of immunosuppressive drugs. *Eur Respir J* 34:702-710
88. Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, Kampmann B, Hellmich B, Groves R, Schreiber S, Wallis RS, Sotgiu G, Scholvinck EH, Goletti D, Zellweger JP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P, Bossink A, Duarte R, Erkens C, Clark J, Migliori GB, Lange C (2010) The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 36:1185-1206

89. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63:1710-1717
90. Soysal A, Turel O, Toprak D, Bakir M (2008) Comparison of positive tuberculin skin test with an interferon-gamma-based assay in unexposed children. *Jpn J Infect Dis* 61:192-195
91. Stefan DC, Dippenaar A, Detjen AK, Schaaf HS, Marais BJ, Kriel B, Loebenberg L, Walzl G, Hesselning AC (2010) Interferon-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with cancer. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:689-694
92. Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell PC, Ramsay A, Pai M, Laal S (2009) Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 16:260-276
93. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M (2007a) Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 4:e202
94. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M (2007b) A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Thorax* 62:911-918
95. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO (2009) Pattern and diversity of cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol* 39:723-729
96. Taylor RE, Cant AJ, Clark JE (2008) Potential effect of NICE tuberculosis guidelines on paediatric tuberculosis screening. *Arch Dis Child* 93:200-203
97. Taylor S, Bryson YJ (1985) Impaired production of gamma-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage. *J Immunol* 134:1493-1497

98. Thegerstrom J, Friman V, Nylen O, Romanus V, Olsen B (2008) Clinical features and incidence of *Mycobacterium avium* infections in children. *Scand J Infect Dis* 40:481-486
99. Thomas B, Pugalenth A, Patel H, Woltmann G, Bankart J, Hoskyns W (2011) Concordance between tuberculin skin test and interferon-gamma assay and interferon-gamma response to mitogen in pediatric tuberculosis contacts. *Pediatr Pulmonol*
100. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL (2003) Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 3:578-590
101. Van-Lume DS, De Souza JR, Cabral MM, Rego JC, Balbino V, Saad MH, Schindler HC, Abath FG, Montenegro SM (2010) Immunological diagnosis of tuberculosis based on recombinant antigens ESAT-6 and CFP-10 in children from an endemic area in northeast Brazil. *Scand J Immunol* 72:460-468
102. van Zyl-Smit RN, Zwerling A, Dheda K, Pai M (2009) Within-subject variability of interferon-g assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. *PLoS ONE* 4:e8517
103. Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ (1998) Normal human CD4⁺ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol* 161:5284-5295
104. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A (2011) Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*
105. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM (2002) A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 57:804-809
106. WHO (2010a) Fact sheet N°104.
107. WHO (2010b) Global Tuberculosis Control: WHO report 2010.
108. WHO (2011). Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement. (Geneva, Switzerland)

109. Yew WW, Lange C, Leung CC (2011) Treatment of tuberculosis: update 2010. *Eur Respir J* 37:441-462
110. Zrinski Topic R, Zoricic-Letoja I, Pavic I, Dodig S (2011) Indeterminate results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in nonimmunosuppressed children. *Arch Med Res* 42:138-143
111. Zwerling A, Behr MA, Verma A, Brewer TF, Menzies D, Pai M (2011) The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS Med* 8:e1001012

10 Publikationen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei folgenden wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

09/2009 Annual Meeting of the European Respiratory Society, Wien

Postervortrag “Whole blood analysis of latent tuberculosis infection in healthy infants and infants with cystic fibrosis and Crohn´s disease in a low prevalence country”.

06/2011 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, Saarbrücken, diese Arbeit wurde mit einem **Posterpreis** ausgezeichnet.

Postervortrag “Die Anwendung eines IFN γ release assays zur Diagnostik einer latenten Tuberkuloseinfektion bei Gesunden und Kindern mit chronischen Erkrankungen“.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich den Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat Martina Sester, sowie Herrn PD Dr. med. Urban Sester danken, dass Sie in mir das Interesse an wissenschaftlichem Arbeiten geweckt haben. Sie haben mit sehr viel Geduld, Ihrem Fachwissen und Ihrer Kritik, sowie dem nötigen Ansporn dafür gesorgt diese Arbeit abzuschließen. Durch Ihre freundschaftliche Art schaffen sie ein Arbeitsklima, welches für jeden Doktoranden wünschenswert wäre.

Unserer MTA Candida Guckelmus danke ich für Ihre Hilfe und Ihrer Geduld beim Wiedergutmachen kleiner Pippetierfehler. Sie brachte mir sauberes und effizientes Arbeiten bei. Nebenbei lernte ich auch jede Menge Strafkuchen zu backen.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Dockter und dem Team der endokrinologischen Ambulanz der Kinderklinik Homburg. Ohne Sie wäre eine Untersuchung von so vielen kleinen Patienten in diesem Maße nicht möglich gewesen.

Insgesamt möchte ich der gesamten AG Sester für das wunderbare Arbeitsklima danken. Die zahlreichen Laborfeste und Ausflüge gaben oft genug den nötigen Antrieb zum Weitermachen.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie für die ständige Unterstützung in allen Bereichen meines Lebens.